Aus der Abteilung Cytopathologie
(Leiter Prof. Dr. Dr. P. Pfitzer)
des Pathologischen Institutes der
Universität Düsseldorf
(Direktor Prof. Dr. W. Hort)

VERGLEICHENDE MESSUNGEN DES DNA-GEHALTES VON MYOCARDKERNEN MIT DEM IMPULS-CYTOPHOTOMETER UND DEM SCANNING-MIKROSKOPPHOTOMETER

Dissertation zur Erlangung des
Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der
Universität Düsseldorf

vorgelegt von

R. Jacksch und M. Harm

1980

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536504_0113

Aus der Abteilung Cytopathologie
(Leiter Prof. Dr. Dr. P. Pfitzer)
des Pathologischen Institutes der
Universität Düsseldorf
(Direktor Prof. Dr. W. Hort)

VERGLEICHENDE MESSUNGEN DES DNA-GEHALTES VON MYOCARDKERNEN MIT DEM IMPULS-CYTOPHOTOMETER UND DEM SCANNING-MIKROSKOPPHOTOMETER

Dissertation zur Erlangung des
Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der
Universität Düsseldorf

vorgelegt von

R. Jacksch und M. Harm

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez. Prof. Dr. Straßburg

Referent
gez. Prof. Dr. Dr. Pfitzer

Korreferent
gez. Prof. Dr. Schulte

1. EINLEITUNG 1

2. MATERIAL UND METHODEN 1
2.1. Material 1
2.2. Methoden 2
2.2.1. Enzymatische Verarbeitung des Herzgewebes 2
2.2.2. Cytophotometrie 3
2.2.2.1. Scanning-Cytophotometrie 3
2.2.2.2. Impuls-Cytophotometrie 4
2.2.2.2.1. Präparation 4
2.2.2.2.2. Messung des DNA-Gehaltes 4
2.3. Statistische Auswertung 4

3. ERGEBNISSE 5
3.1. Vorversuche 5
3.2. Allgemeine Ergebnisse der Scanning-Cytophotometrie 9
3.3. Allgemeine Ergebnisse der Impuls-Cytophotometrie 20
3.4. Allgemeine Ergebnisse der Computeranalyse 22
3.5. Vergleich der Ergebnisse der Scanning- und der Impuls-Cytophotometrie 24
3.6. Spezielle Meßergebnisse 28
3.6.1. Herzen mit angeborenen Mißbildungen 28
3.6.1.1. Fallotsche Tetralogie 28
3.6.1.2. Transposition der großen Gefäße 30
3.6.2. Hypertrophierte Erwachsenenherzen 36
3.6.3. Normalgewichtige Erwachsenenherzen 40

4. DISKUSSION 41
4.1. Isolation von Myocardkernen 41
4.2. Die Methode der Impuls-Cytophotometrie 41
4.3. Mögliche Ursachen unterschiedlicher Ergebnisse der SMP- und ICP-Methode 42
4.4. Polyploidisierung bei Kinderherzen mit Fallotscher Tetralogie und TGA 46

5. ZUSAMMENFASSUNG 49

1. EINLEITUNG

Bei den bisherigen Messungen des DNA-Gehaltes von Myocardkernen bediente man sich der aufwendigen Technik der Scanning-Cytophotometrie (SANDRITTER und SCOMAZZONI, 1964; PFITZER und CAPURSO, 1970); PFITZER, 1971; ADLER und HUECK, 1971; ADLER und SANDRITTER, 1971). Auf Grund des erheblichen Zeitaufwandes mußte man sich auf eine relativ kleine Zahl von Messungen beschränken und konnte die subjektive Bevorzugung morphologisch besonderer Zellen nicht ausschließen. Erste erfolgreiche Messungen großer Zellzahlen von Tumoren und Ergüssen im Durchflußverfahren mit dem Impuls-Cytophotometer bedeuteten einen großen Fortschritt für diesen Forschungsbereich (SCHUMANN et al., 1971; GÖHDE et al., 1972; SPRENGER und SANDRITTER, 1972; GORYSCH und PFITZER, 1975; STECHER und PFITZER, 1976). Die Vorteile der Impuls-Cytophotometrie (PFITZER, 1978) könnten auch für das Gebiet der DNA-Messung von Myocardkernen einen großen Fortschritt bedeuten. Ziel dieser Arbeit war es, in einer vergleichenden Untersuchung von SMP und ICP die bestehende Problematik der Impuls-Cytophotometrie zu klären und aufzuzeigen, wie weit sich beide Methoden sinnvoll kombinieren lassen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

Fünf Schweineherzen, die wir innerhalb 1 - 2 Stunden nach der Tötung verarbeiteten, wurden für Vorversuche verwandt, um die optimale Methode der enzymatischen Isolierung von Herzmuskelkernen an frischem Gewebe zu erproben.

Anschließend untersuchten wir insgesamt 51 menschliche Herzen, die zwischen 16 und 74 Stunden post mortem bei der Autopsie entnommen worden waren.

Dabei handelt es sich um:

1. 17 Herzen mit angeborenen Mißbildungen, die später im Text als "hypertrophierte Kinderherzen" aufgeführt werden. In 12 Fällen waren es Transpositionen der großen Arterien (TGA) im Alter von einem Tag bis 30 Jahren und in fünf Fällen Herzen mit Fallotscher Tetralogie im Alter von 6 bis 40 Jahren. Von diesen 17 Herzen waren 14 bis zur enzymatischen Verarbeitung für längere Zeit tiefgefroren aufbewahrt worden.
2. 22 hypertrophierte Herzen (400 - 750 g) stammten von Erwachsenen zwischen 18 und 86 Jahren. Dabei wiesen 9 eine Hypertrophie des linken Ventrikels, 10 eine kombinierte Links-Rechts-Hypertrophie und je ein Herz eine Cardiomegalie bei Akromegalie, idiopathischer Cardiomyopathie und IHSS auf.
3. 12 auslesefreie, normalgewichtige Herzen (260 - 390 g) stammten von Jugendlichen und Erwachsenen zwischen 18 und 77 Jahren.

2.2. Methoden

2.2.1. Enzymatische Verarbeitung des Herzgewebes

Die Entnahme des Herzmuskelgewebes erfolgte lateral aus der linken und rechten Ventrikelwand. Die Gewebsstücke wurden vor der Zerkleinerung möglichst vollständig vom Epi- und Endocard befreit. Von den meist dünnen Gewebestreifen der rechten Kammerwand war dies nur unvollständig möglich. Von Erwachsenenherzen verwendeten wir durchschnittlich Mengen von 5 - 10 g. Die Menge des Myocards spielte jedoch für die erfolgreiche Verarbeitung keine entscheidende Rolle. Selbst wenn bei Kinderherzen nur 3 g Gewebe zur Verfügung standen, war noch eine genügend hohe Ausbeute an Zellkernen zu erreichen.

Nach Zerkleinerung mit einer Schere erfolgte die Inkubation in 0,1%iger Collagenase auf einem Magnetrührer. Der Erlenmeyer-Kolben stand dabei in einem Wasserbad von 37 ^{o}C. Die Menge der Enzymlösung richtete sich nach der Menge des Myocards und betrug bei

5 g Ausgangsmaterial etwa 8 ml für eine erste, 6 ml für eine zweite und 4 ml für eine dritte Inkubation. Nach jeweils zwei, fünf und zehn Minuten wurde der Überstand durch ein doppeltes Gazefilter abgegossen und dem im Erlenmeyer-Kolben verbliebenen Myocard sofort wieder frisches Enzym zugesetzt.

Die abgegossenen Überstände wurden fünf Minuten bei ca. 1500 - 2000 U/min zentrifugiert, anschließend einmal mit physilogischer Kochsalzlösung gewaschen, zentrifugiert und das Sediment in 2 ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Je zwei Tropfen wurden für Präparate verwandt, die mit der Cytozentrifuge (Shandon) hergestellt wurden. Die restliche Suspension wurde erneut zentrifugiert und das Sediment in absolutem Alkohol fixiert.

Vor der Zerkleinerung des Myocards waren jeweils vom linken und rechten Ventrikel Abstrichpräparate zur Kontrolle angefertigt worden (PFITZER und CAPURSO, 1970).

2.2.2. Cytophotometrie

2.2.2.1. Scannig-Cytophotometrie

Nach Zentrifugation der Suspension in der Cytozentrifuge wurden die Präparate kurze Zeit luftgetrocknet, dann für 30 min in absolutem Äthanol fixiert, nach der üblichen Methode mit der Feulgen-Reaktion gefärbt und in Eukitt eingebettet. In diesen Präparaten bestimmten wir mit dem Scanning-Mikroskop-Photometer (SMP) ZEISS den DNA-Gehalt von je 100 einzelnen Herzmuskelkernen und 5 Endocard- oder Bindegewebskernen. Die Steuerung geschah durch den Rechner PDP 12, Programm APAMOS II, Wellenlänge 570 nm, Meßblende und Schrittgröße 1/2 µ.

2.2.2.2. Impuls-Cytophotometrie

2.2.2.2.1. Präparation

Wir verwendeten das Gerät ICP 11 PHYWE. Die in Alkohol fixierten Myocardzellen wurden einmal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und nach Zentrifugation für eine Stunde mit 1%iger Ribonuclease-Lösung bei 37 °C behandelt. Nach anschließender Zentrifugation und Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung erfolgte zur Verdauung des Cytoplasmas für 15 min die Inkubation mit 1000 IE Pepsin (MERCK) bei 37 °C. Nach erneutem Waschen und Zentrifugieren färbten wir das Sediment mit Ethidiumbromid bei Zimmertemperatur für 20 - 30 min. Vor der Messung wurden die Zellsuspensionen nach einer Ultraschallbehandlung (20 sec), die zur Trennung von Kernverklumpungen diente, durch einen Filter mit 70 µ Maschenweite in die ICP-Meßröhrchen filtriert.

2.2.2.2.2. Messung des DNA-Gehaltes

Nach einer Eichung des ICP mit einer Suspension von Hühnererythrocyten mit dem Maximum in Kanal 10 lagen die Maxima für 2C-Kerne bei Kanal 20, für 4C-Kerne bei Kanal 40 und für 8C-Kerne bei Kanal 80. Bei einer Pulsrate zwischen 200 - 950 / sec betrug die Gesamtzahl der Messungen zwischen 5000 und 20000 Kerne oder Kernfragmente pro Histogramm.

2.3. Statistische Auswertung

Zur genaueren Flächenberechnung und Analyse der im ICP gewonnenen Diagramme benutzten wir ein Programm zur Analyse der Histogramme durch den Computer (PFITZER et al., 1976; VYSKA et al., 1977).

3. ERGEBNISSE

3.1. Vorversuche

Die Vorversuche mit Schweineherzen, bei denen anfänglich zur Isolation einzelner Myocardzellen eine Enzymlösung mit O,1%iger Collagenase und O,2%iger Hyaluronidase verwandt wurde, ergaben, daß in den meisten Zellkernen des Schweinemyocards eine tropfige Degeneration hervorgerufen wurde. Bei Zusatz von Heparin, das die Hyaluronidase inhibiert, trat die tropfige Degeneration des Kerns in den Hintergrund. Bei ausschließlicher Verwendung von Hyaluronidase war die tropfige Degeneration besonders ausgeprägt. Außerdem korrelierte die Stärke der tropfigen Degeneration mit der Inkubationszeit von zwei, fünf und zehn Minuten (Abb. 1a - d). Erfahrungsgemäß hat dies zur Folge, daß die Myocardkerne verminderte DNA-Werte aufweisen (PFITZER und SCHULTE, 1972).

Die ICP-Diagramme zeigten bei alleiniger Verwendung von O,1%iger Collagenase im 2C-Kanalbereich einen dominierenden schlanken Gipfel, dem in den meisten Fällen ein kleiner Schuttgipfel vorausging. Ein weiterer im Vergleich zu 2C sehr kleiner Gipfel erschien im Kanalbereich der 4C-Klasse (Abb. 2). Demgegenüber ergaben die Präparationen mit Hyaluronidase und Collagenase einen stark ausgeprägten Schuttgipfel, der oft vom 2C-Gipfel nicht zu trennen war (Abb. 3). Der abfallende Teil des 2C-Gipfels war durch die überlagernde Schutthyperbel nach rechts verbreitert und ließ dann meist keinen 4C-Gipfel erkennen. Dieses Verhalten der ICP-Meßkurven war bei alleiniger Verwendung von Hyaluronidase besonders stark ausgeprägt und nahm mit zunehmender Inkubationszeit noch zu.

Bei Menschenherzen, die zwischen 18 und 74 Stunden nach dem Tod untersucht wurden, bewirkte die Hyaluronidase eine wesentlich geringere tropfige Degeneration der Kerne. Bei alleiniger Verwendung von Collagenase kommt es dagegen zum Auftreten von Vakuolen im Zellkern (Abb. 4a,b). Wie vergleichende Messungen ergaben, wirkten sich die Vakuolen auf die Meßergebnisse im SMP jedoch nicht aus. In den Collagenase-Präparaten lagen die Myocardzellen häufiger in netzartigen, nicht völlig gelösten Verbänden zusammen als bei der

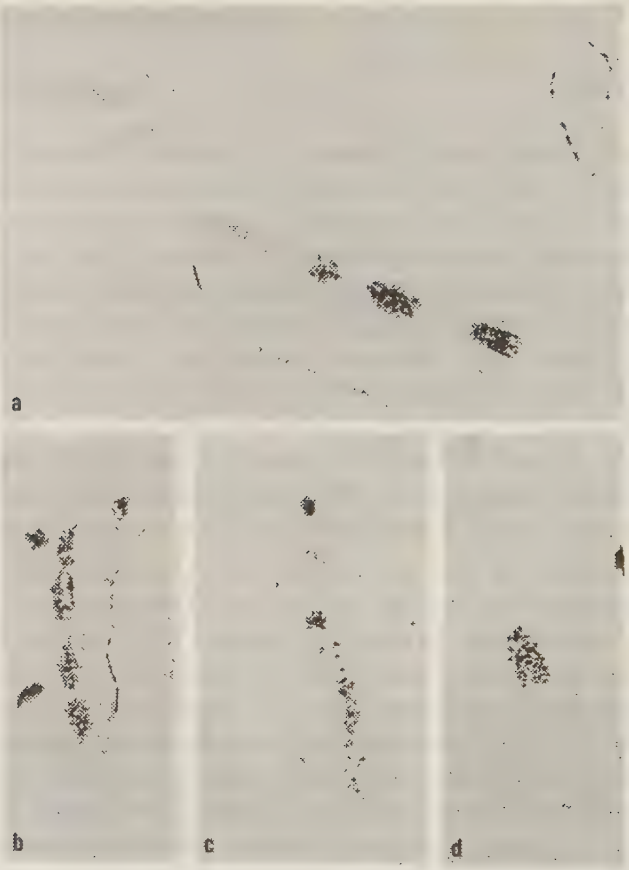


Abb. 1. Tropfige Degeneration von Schweinemyocardkernen bei alleiniger Verwendung von Hyaluronidase und zunehmender Inkubationszeit (Feulgen, 800x).

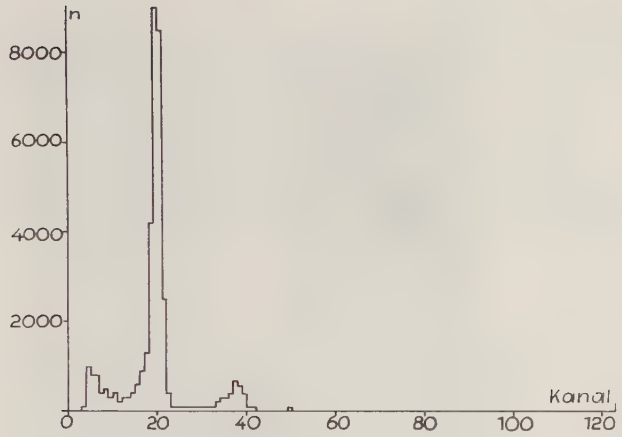


Abb. 2. ICP-Diagramm der DNA-Klassenverteilung von Schweinemyocardkernen bei alleiniger Verwendung von 0,1%iger Collagenase. Maximum der 2C-Kerne bei Kanal 20, der 4C-Kerne bei Kanal 38.

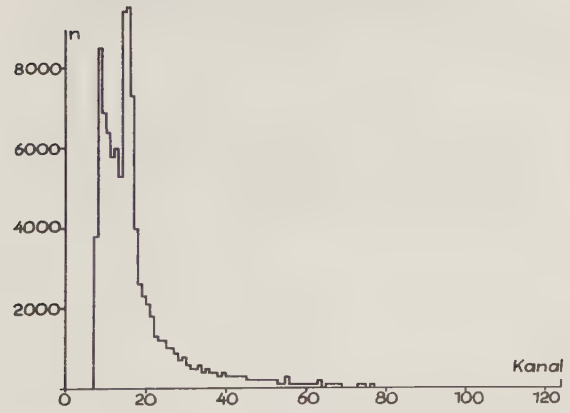


Abb. 3. ICP-Diagramm der DNA-Klassenverteilung von Schweinemyocardkernen bei Verwendung von Hyaluronidase und Collagenase. Maximum der 2C-Kerne bei Kanal 16.

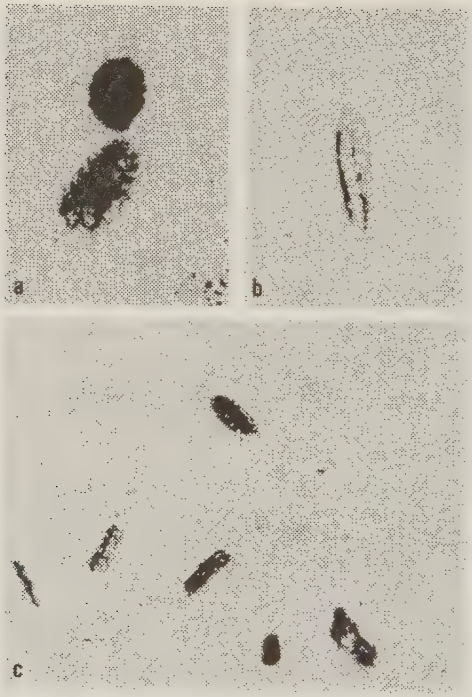


Abb. 4. Vermehrtes Auftreten von Vakuolen in Schweine-myocardkernen bei der Isolation mit Collagenase (a,b: 1200x; c: 500x).

Verwendung von Hyaluronidase (Abb. 4c). Für die Messung mit dem ICP waren diese einschichtigen Zellverbände jedoch unwesentlich, da bei der weiteren Verarbeitung der Zellsuspensionen mit Pepsin und Ribonuclease die Kerne vom Cytoplasma weitgehend befreit wurden.

Auf Grund dieser Ergebnisse führten wird die DNA-Messungen mit dem ICP nach enzymatischer Isolation mit O,1%iger Collagenase durch.

3.2. Allgemeine Ergebnisse der Scanning-Cytophotometrie

Unsere 6600 Einzelmessungen mit dem SMP an einer größeren Anzahl der insgesamt bearbeiteten Fälle wurde an Sedimentationspräparaten von 17 hypertrophierten Kinderherzen (Tab. 1), 15 hypertrophierten Erwachsenenherzen (Tab. 2) und an 5 normalgewichtigen Erwachsenenherzen (Tab. 3) durchgeführt. Die Messungen bestätigten hinsichtlich des Polyploidisierungsgrades frühere Ergebnisse, die an Abstrichpräparaten gewonnen worden waren (PFITZER, 1971).

Die Streuung der Gesamtextinktionswerte innerhalb der einzelnen Polyploidieklassen nach enzymatischer Isolierung der Zellen stimmte in unseren Sedimentationspräparaten mit 7,7% bis 13% (Tab. 4) annähernd mit dem von PFITZER und CAPURSO (1970) angegebenen Bereich von 8% - 12% in Abstrichpräparaten überein. Trotz einer größeren Streuung der Gesamtextinktionswerte bei hypertrophierten Herzen war eine eindeutige Trennung der DNA-Klassen möglich. Lediglich bei vier Präparaten (Tab. 2, Nr. 5, 18, 22, Abb. 19c; Tab. 3, Nr. 3) gingen die DNA-Klassen ineinander über.

Der Vergleich der von uns ermittelten Variationskoeffizienten mit denen in der Arbeit von PFITZER und Mitarbeitern (1976) in Abstrichpräparaten gefundenen Werte ergab Unterschiede. Bei normalgewichtigen Herzen Erwachsener waren unsere in SMP-Präparation gewonnenen Variationskoeffizienten sowohl für den linken als auch für den rechten Ventrikel in der 2C-Klasse höher, in der 4C- und 8C-Klasse niedriger (Tab. 4). Bei den hypertrophierten Herzen waren unsere Variationskoeffizienten in allen Klassen höher, bei hyper-

Tab. 1.

Nr.	Alter	m/w	Körperge-wicht (kg)	Herzgewicht (kg)	rel. HG (%)	links: SMP 2C	S	4C	6C	8C	16C	32C	rel. DNA-Gehalt/ Kern	links: ICP 2C	S	4C	6C	8C	rel. DNA-Gehalt/ Kern
FALLOTSCHE TETRALOGIE																			
1	2 J.	w	9,9	89	0,90	69		27		4			2,8						
2	4 J.	m	16,0	98	0,61	89		9		2			2,3						
3	5 J.	m	15,0	132	0,88	71		26		3			2,7						
4	6 J.	m	24,0	175	0,73	74		23		3			2,6	70		30			2,6
5	6 J.	m	20,0	163	0,82	96		4					2,1	92		8			2,2
6	8 J.	w	16,5	-	-	61		39					2,8	76		24			2,5
7	8 J.	m	24,0	165	0,69														
8	9 J.	w	20,0	381	1,91	7		57		32	4		5,6						
9	19 J.	w	46,0	335	0,73	15		54	3	24	*2	**2	5,2						
10	40 J.	m	53,0	-	-														
TRANSPOSITION DER GROSSEN ARTERIEN																			
11	2 T.	m	4,6	18	0,39	97		3					2,1	93		7			2,1
12	2 T.	w	3,1	21	0,68	94		6					2,1						
13	8 T.	m	3,0	-	-	100							2,0	91		9			2,2
14	25 T.	m	3,3	-	-									86		14			2,3
15	1 M.	w	3,5	40	1,14	62		34		4			2,9	62		35	3		2,9
16	1 M.	w	3,7	27	0,73	83	2	14	1				2,3						
17	5 W.	m	3,8	28	0,74									90		10			2,2
18	5 W.	m	4,0	68	1,70	72		27		1			2,6	73		22	5		2,7
19	2 M.	m	2,9	48	1,66	92		8					2,2	83		17			2,3
20	3 M.	m	4,3	44	1,02	74		25		1			2,6						
21	5 M.	w	4,4	29	0,66	91		9					2,2						
22	9 M.	m	7,2	57	0,79	89		10		1			2,3	87		13			2,3
23	3 J.	m	13,5	-	-	48	1	48	1	2			3,1	62		31	5	2	2,9
24	3 J.	m	15,5	-	-	52		45		3			3,1	56	1	35	5	3	3,1
25	6 J.	m	14,0	-	-	25		51		22	1	1	4,8	65		24	6	5	3,0
26	30 J.	m	48,0	615	1,28	54		38											

* 12 C: 1 ** 20 C: 1

2C-Myocard-anteil (%)	nichtmyocard./ myocard. 2C-Kern	rechts: SMP 2C	S	4C	6C	8C	16C	32C	rel. DNA-Gehalt/ Kern	rechts: ICP 2C	S	4C	6C	8C	rel. DNA-Gehalt/ Kern	2C-Myocard-anteil (%)	nichtmyocard./ myocard. 2C-Kern	Nr.
		69		31					2,6									1
		42		48		9			3,9									2
		28		49		23			4,4									3
																		4
55,6	0,8	61		27		9	3		3,5	79		20	1		2,4			5
49,2	1,0	60		34		6			3,0	78		18		4	2,6	41,2	1,4	6
		38	1	44	1	16			3,9	51	4	35	3	7	3,3	52,8	1,1	7
		26	2	42	2	24	1	3	9,6									8
		18		53	1	21	4	2 1	5,3									9
		33		43		23	1		4,4	71		24		5	2,8	20,7	3,8	10
																		11
		85		13	1	1			2,4									12
		92		8					2,2	90		10			2,2			13
		86		14					2,3	78		22			2,4			14
		81		19					2,4	81		19			2,4			15
		80	2	18		1			2,4									16
		95		5					2,1	92		8			2,4			17
																		18
																		19
		46		51		3			3,2									20
		53	2	37		7	1		3,3									21
																		22
60,5	0,7	37		46		17			3,9	63		28	4	5	3,0	30,6	2,5	23
71,8	0,4	72		28					2,6	65		27	6	2	2,9			24
15,3	5,5	63		32		5			3,0	81	2	17			2,4	40,8	1,5	25
47,0	1,1	42		48	2	8			3,5	72		23	3	2	2,7	29,0	2,4	26

Tab. 2.

Nr.	Alter	m/w	Körperge-wicht (kg)	Herzgewicht (kg)	rel. HG (%)	links: SMP							rel. DNA-Gehalt/ Kern	links: ICP					rel. DNA-Gehalt/ Kern
						2C	S	4C	6C	8C	16C	32C		2C	S	4C	6C	8C	
1	86 J.	w	43	400	0,93	25		59		14	2		4,3	74		24		2	2,6
2	66 J.	m	72	450	0,63	35		57		8			3,6	61		33	2	4	3,0
3	44 J.	w	66	480	0,73	33		24		35	8		4,3	76		16		8	2,8
4	72 J.	m	68	520	0,76	21		56		20	3		4,7	71	2	24		3	2,7
5	61 J.	m	73	530	0,73	15		49		30	6		5,6	57		21	5	17	3,6
6	47 J.	w	62	555	0,90	26	4	55	2	13			4,0	66		28	3	3	2,9
7	63 J.	m	106	570	0,54	36		59		5			3,5	55		44		1	2,9
8	79 J.		74	570	0,77	24		70		5	1		3,8	55		40		5	3,1
9	56 J.	w	77	430	0,56														
10	81 J.	m	-	500	-														
11	41 J.	m	86	530	0,62														
12	83 J.	m	52	650	1,25														
13	75 J.	m	53	670	1,26														
14	61 J.	m	71	680	0,96														
15	71 J.	m	84	700	0,83														
16	26 J.	w	62	520	0,84	14		67		19			4,5	51		48		1	3,0
17	51 J.	w	58	570	0,98	13		19	42	22	4		5,9	84		12		4	2,5
18	54 J.	w	63	620	0,98	25		38	3	26	8		5,6						
19	68 J.	m	79	730	0,92	12		35		38	15		7,1	76	1	15		8	2,8
20	18 J.	m	64	595	0,93	68		11		11	10		4,3						
21	50 J.	m	71	695	0,98	23		34		34	6	3	6,5	75		12	5	8	2,9
22	44 J.	w	79	750	0,95	7		53		37	3		5,7	45		24		31	4,3

2C-Myocard-anteil (%)	nichtmyocard./ myocard. 2C-Kern	rechts: SMP 2C S	4C	6C	8C	16C	32C	rel. DNA-Gehalt/ Kern	rechts: ICP 2C S	4C	6C	8C	rel. DNA-Gehalt/ Kern	2C-Myocard-anteil (%)	nichtmyocard./ myocard. 2C-Kern	Nr.
13,8	6,3	40	50		10			3,6	74	25			2,6	27,6	2,6	1
32,7	2,1	64	34		2			2,8	75	25			2,5	59,7	0,7	2
18,2	4,5	67	26		6	1		3,0	77	23			2,5	77,0	0,2	3
10,4	8,6	59	36		5			3,0	77	22	1		2,5	47,6	1,1	4
12,6	6,9	53	37		8	2		3,5	63	34	3		2,8	76,4	0,3	5
39,1	4,1	49	15	7	20	9		5,0	76	12	4	8	2,9	18,2	1,6	6
44,5	1,2	75	24		1			2,5	82	18			2,4	67,9	0,5	7
26,4	2,8	45	53		2			3,2	77	23			2,5	24,9	3,0	8
									75	19	6		2,6			9
									69	31			2,6			10
									74	21	5		2,6			11
									60	40			2,8			12
									75	25			2,5			13
									85	15			2,3			14
									82	15	3		2,4			15
19,9	4,0	24	57	3	15	1		4,3	73	23		4	2,3	12,4	7,1	16
24,0	4,0	38	53		9			3,6	71	24	2	3	2,7	23,2	3,3	17
		30	20		36	6	8	7,8								18
20,0	4,7	24	50		22	4		4,9	81	16		3	2,5	11,9	7,7	19
		79	14		5	2		2,9								20
9,9	9,2	38	61		1			3,3	68	32			2,6	29,1	2,4	21
9,4	9,6	14	46	1	37	2		5,5	45	24		31	4,3	16,7	4,7	22

Tab. 3.

Nr.	Alter	m/w	Körperge-wicht (kg)	Herzgewicht (kg)	rel. HG (%)	links: SMP							rel. DNA-Gehalt/ Kern	links: ICP					rel. DNA-Gehalt/ Kern
						2C	S	4C	6C	8C	16C	32C		2C	S	4C	6C	8C	
1	38 J.	w	41	260	0,63									64		31	3	2	2,9
2	74 J.	w	63	270	0,43									54		33	3	10	3,4
3	38 J.	w	51	290	0,57	48		48		4			3,2	56		40	2	2	3,0
4	41 J.	m	53	290	0,55									54		38	2	6	3,2
5	18 J.	w	56	300	0,54	30		67		3			3,5	47	3	47	1	2	3,1
6	43 J.	w	70	310	0,44	6		85		9			4,2	52		44		4	3,1
7	40 J.	w	67	310	0,46									75		25			2,8
8	77 J.	m	51	320	0,63									54	7	39			2,9
9	61 J.	w	51	340	0,67	29		70		1			3,5	69		31			2,6
10	43 J.	m	58	370	0,64	17		67	1	14	1		4,4	51		49			3,0
11	22 J.	w	60	380	0,62									46		33	8	13	3,8
12	19 J.	m	79	390	0,49									61		30	6	3	3,0

2C-Myocard-anteil (%)	nichtmyocard./ myocard. 2C-Kern	rechts: SMP 2C	S	4C	6C	8C	16C	32C	rel. DNA-Gehalt/ Kern	rechts: ICP 2C	S	4C	6C	8C	rel. DNA-Gehalt/ Kern	2C-Myocard-anteil (%)	nichtmyocard./ myocard. 2C-Kern	Nr.
										71		26	3		2,6			1
										72		24	3	1	2,7			2
72,6	2,7	72		27		1			2,6	76		24			2,5	85,0	1,2	3
										92		8			2,2			4
39,0	1,8	63		36		1			2,8	74	6	20			2,5	48,0	1,1	5
16,3	6,2	28		63	1	8			3,2	64		35		1	2,8	22,4	3,5	6
										84		16			2,3			7
										67	19	14			2,5			8
18,0	4,4	42		57		1			3,2	80		20			2,4	18,0	4,6	9
22,0	3,5	41		53		6			3,4	82		18			2,4	17,0	5,0	10
										49		39	5	7	3,4			11
										94		6			2,1			12

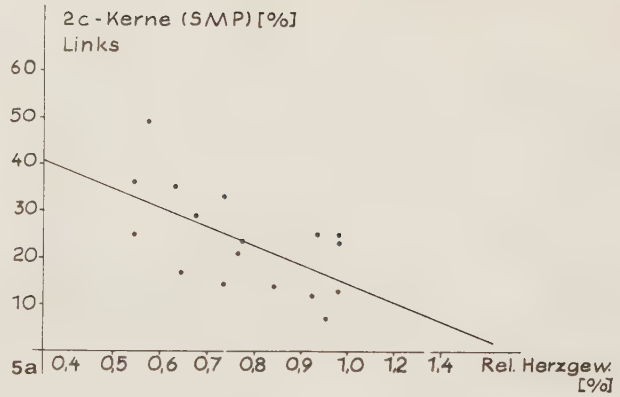
Tabelle 4

		Variationskoeffizienten der Gesamtextinktionswerte in den SMP-Präparaten				
		2C	4C	8C	16C	32C
normalgewichtige Erwachsenenherzen	links:	(N7) 12,29%	(N7) 9,03%	(N5) 7,87%	/	/
	rechts:	(N4) 13,06%	(N4) 9,29%	(N2) 8,44%	/	/
hypertrophierte Erwachsenenherzen	links und rechts zusammengefaßt:	(N27) 12,37%	(N27) 9,32%	(N23) 8,96%	(N25) 11,27%	(N3) 8,62%
Kinderherzen mit angeborenen Herzfehlern	links und rechts zusammengefaßt:	(N25) 8,67%	(N24) 8,11%	(N13) 7,73%	/	/

trophierten Kinderherzen in allen Klassen niedriger (Tab. 4). Entsprechend den niedrigeren Variationskoeffizienten in den SMP-Präparaten zeigten auch die ICP-Histogramme der hypertrophierten Kinderherzen die schlankesten Gipfel.

Das relative Herzgewicht ist als der prozentuale Anteil des absoluten Herzgewichts am Körpergewicht definiert. Während der Vergleich aller SMP-Werte von normalgewichtigen und hypertrophierten Erwachsenenherzen mit dem relativen Herzgewicht eine signifikante Korrelation ergab (Abb. 5 - 7), konnten wir keine signifikante Korrelation der SMP-Werte mit dem absoluten Herzgewicht feststellen.

Wie die Abb. 5a,b zeigen, ist der mit steigendem relativem Herzgewicht korrelierte Abfall der 2C-Werte in den linken Ventrikeln schwächer ausgeprägt als in den rechten Ventrikeln. Während links die 4C-Werte noch mit steigendem relativem Herzgewicht abfallen (Abb. 6a), zeigen die 4C-Werte rechts mit zunehmendem relativem Herzgewicht eine deutlich steigende Tendenz (Abb. 6b). Diesen "Umschlag", der in den rechten Ventrikeln schon in der 4C-Klasse stattfindet, finden wir bei den linken Ventrikeln erst in der 8C-Klasse (Abb. 7a). Auch die 8C-Werte der rechten Ventrikel nehmen mit steigendem relativem Herzgewicht zu, diese Zunahme ist aber nicht mehr so ausgeprägt wie in den linken Ventrikeln. Die Abb. 8a,b zeigen dieses unterschiedliche Verhalten von linken und rechten Ventrikeln in jeweils einem Diagramm.



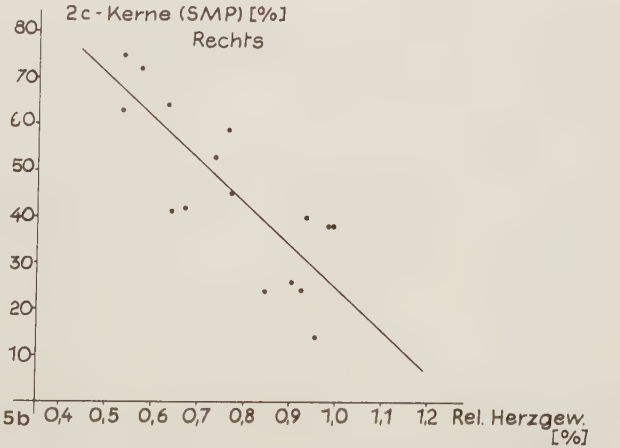
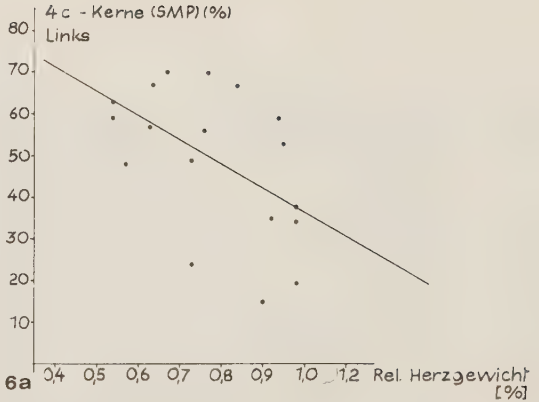


Abb. 5. Korrelation zwischen relativem Herzgewicht (%) und den im SMP gewonnenen Prozentwerten für 2C-Kerne.



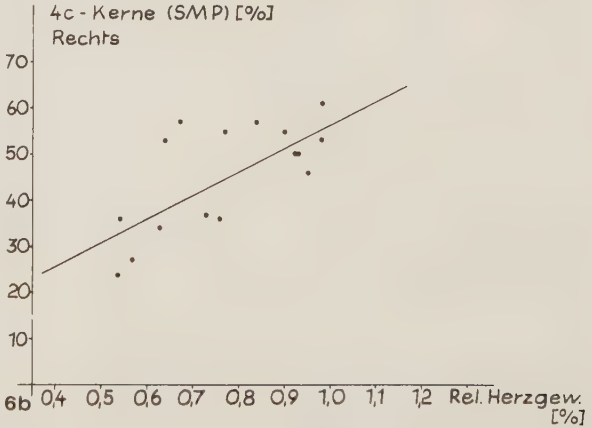
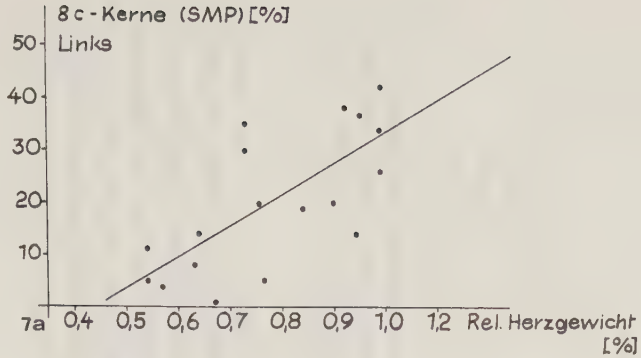


Abb. 6. Korrelation zwischen relativem Herzgewicht (%) und den im SMP gewonnenen Prozentwerten für 4C-Kerne aus linker und rechter Kammerwand normalgewichtiger und hypertrophierter Erwachsenenherzen.



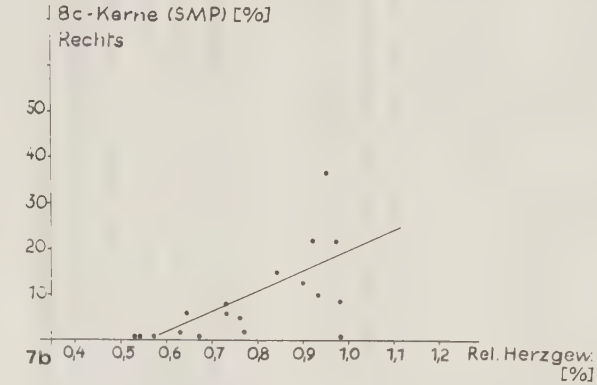
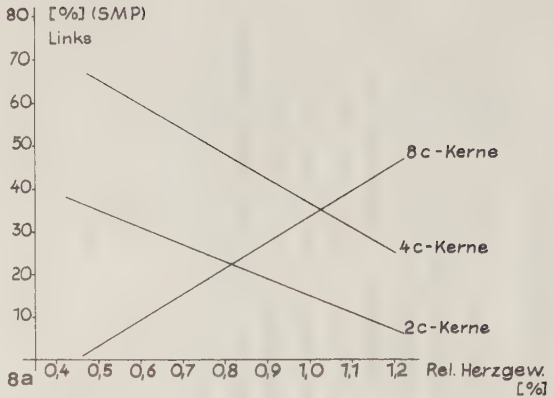


Abb. 7. Korrelation zwischen relativem Herzgewicht (%) und den im SMP gewonnenen Prozentwerten für 8C-Kerne aus linker und rechter Kammerwand normalgewichtiger und hypertrophierter Erwachsenenherzen.



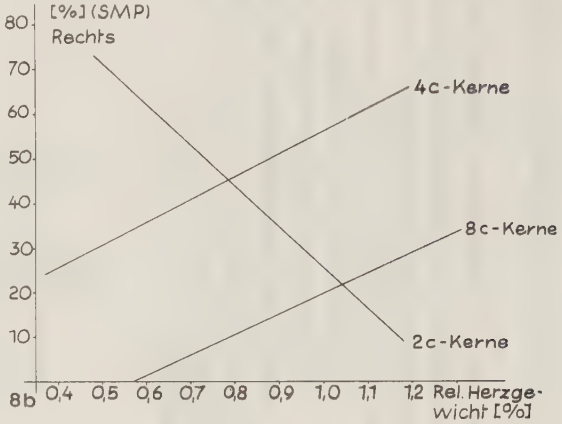


Abb. 8. Zusammenfassung der Abb. 5 - 7.

3.3. Allgemeine Ergebnisse der Impuls-Cytophotometrie

Das Impuls-Cytophotometer beendet die Messung, wenn in einem seiner 128 Kanäle das maximale Fassungsvermögen erreicht ist. Bei unseren Messungen war das immer im Kanalbereich des 2C-Gipfels (Kanal 20 - 25) der Fall. Bei einigen Messungen registrierten wir einen Schuttgipfel, der sein Maximum etwa im Bereich von Kanal 10 hatte. Um ein vorzeitiges Abbrechen der Messung zu vermeiden, unterdrückten wird durch Erhöhung der Meßschwelle Registrierungen in diesem Bereich (Abb. 9). Jedoch blieben als Folge des Schuttanteiles die Steigungen zu Beginn des 2C-Gipfels entsprechend unterschiedlich.

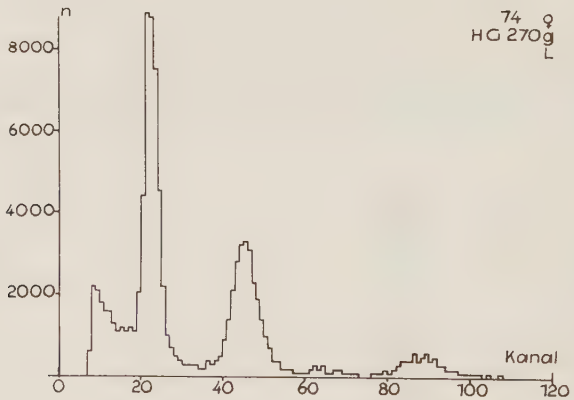


Abb. 9. ICP-Diagramm mit erhöhter Meßschwelle zur Unterdrückung von Registrierungen im Schuttbereich bei Kanal 10 (2C-Maximum bei Kanal 22, 4C-Maximum bei Kanal 44, 8C-Maximum bei Kanal 88).

Bei 83% der insgesamt 132 mit dem ICP untersuchten Proben waren die einzelnen DNA-Gipfel deutlich voneinander abgesetzt. Die Abschnitte zwischen den 2C-, 4C- und den 8C-Gipfeln zeigten dabei jedoch unterschiedliche Verläufe, was möglicherweise von der Qualität der Präparationen abhängig war. Ein Vergleich aller ICP-Diagramme nach dem Gesichtspunkt ihres Verlaufstyps im 2C-4C-Bereich zeigte kontinuierliche Übergänge (Abb. 10a-f).

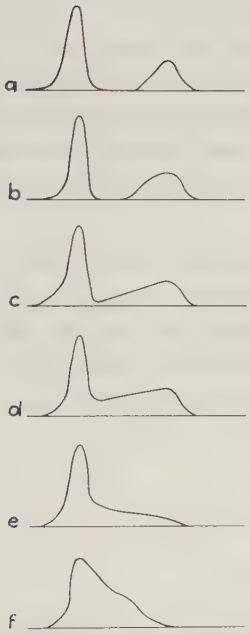


Abb. 10. Verlaufstypen der ICP-Diagramme im 2C-4C-Bereich.

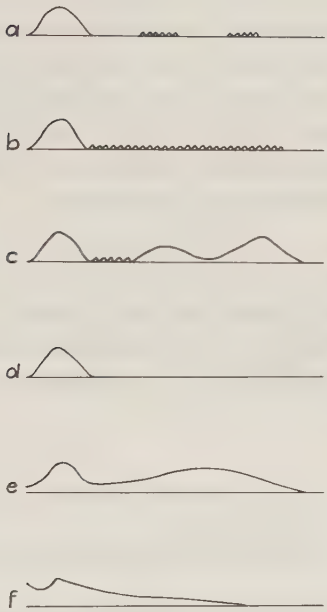


Abb. 11. Verlaufstypen der ICP-Diagramme im 4C-8C-Bereich

Während bei hypertrophierten Kinderherzen das Kurvenverhalten der Abb. 10a und 10b überwog (Abb. 20a,b), verteilte sich bei normalgewichtigen Herzen das Verhalten auf die Typen der Abb. 10c und 10d. Bei 52% der hypertrophierten Herzen entsprach der Kurvenverlauf der Abb. 10d.

Auch im 4C-8C-Bereich konnten wir verschiedene Verlaufstypen unterscheiden (Abb. 11a-f). Der mit etwa 50% vorherrschende Verlaufstyp der Abb. 11c zeigte im 6C- und 8C-Kanalbereich erkennbare DNA-Gipfel, die sich vom unruhigen Kurvenverlauf entlang der Grundlinie mehr oder weniger deutlich abhoben. Obwohl die Kanalbereiche für 4C und 8C (Kanal 40, 80) weiter auseinanderlagen als die für 2C und 4C (Kanal 20, 40), kam es bei diesem Verlaufstyp immer zu einer

Berührung benachbarter Gipfel im Bereich der Grundlinie. Trotzdem waren die Gipfel abgrenzbar.

In keinem der im ICP untersuchten Fälle konnten wir einen 16C- oder 32C-Gipfel registrieren. In Fällen mit hohen 4C- und 8C-Gipfeln versuchten wir, solche von der Scanning-Cytophotometrie her bekannten DNA-Klassen innerhalb der 128 Kanäle des ICP zu erfassen, indem wir durch Reduktion der Spannung die DNA-Gipfel zu niedrigeren Kanalstufen verschoben.

22 der im ICP untersuchten 132 Präparationen konnten wir nicht verwerten. Bei ihnen war eine Differenzierung des 2C- vom 4C-Gipfel nicht möglich (Abb. 10e-f). Als Ursache fanden wir in der Regel Fehler bei der Präparation oder apparatetechnische Störungen. Die Ursache für das Versagen von sieben Präparationen blieb unklar.

3.4. Allgemeine Ergebnisse der Computeranalyse

Mit Hilfe des Programms zur Analyse der Histogramme durch den Computer wurden die signifikanten Maxima der ICP-Kurve aufgesucht und durch Normalverteilungen ersetzt. Durch Optimierungsverfahren wurden die gefundenen Normalverteilungen anschließend der Originalkurve angepaßt. Man erhielt hierdurch folgende Parameter der Einzelmaxima: Mittelwerte ($\bar{x}$) und deren Streuungen ($S_{\bar{x}}$), maximale Ordinatenwerte (y_{max}), dazugehörige Abszissenwerte (x_{max}) und Flächeninhalte (A, A%).

Durch die Zerlegung der Originalkurven in Einzelmaxima ergab sich das Problem der eindeutigen Zuordnung zusätzlicher, neben 2C, 4C und 8C auftretender Einzelmaxima zu einer bestimmten DNA-Klasse, da z.B. entsprechend dem gelegentlich abgeflachten Anstieg der ICP-Kurve zum 2C-Gipfel bei der Analyse vor dem dominierenden Einzelmaximum der 2C-Klasse ein oder mehrere kleinere Maxima (Abb. 12) errechnet wurden. Entsprechend den Verlaufstypen für den 2C-4C-Bereich (Abb. 10a-f) erhielt man bei der Computeranalyse ebenfalls in verschiedener Ausprägung Zwischenmaxima (Abb. 13). Bei idealem Verlaufstyp (Abb. 10a) fehlten diese zusätzlichen Maxima entspre-

Abb. 12 - 14. Zerlegung der ICP-Originalkurve in Einzelmaxima durch die Computeranalyse.

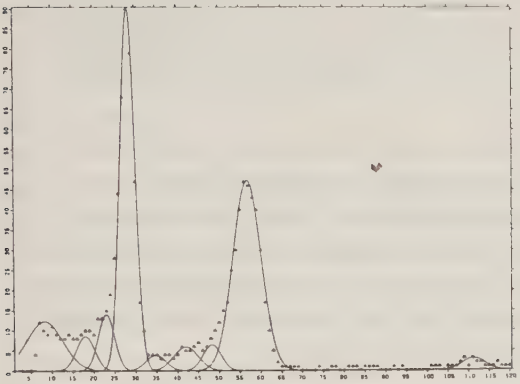


Abb. 12. Einzelmaxima von den dominierenden Maxima der 2C- und 4C-Klasse.

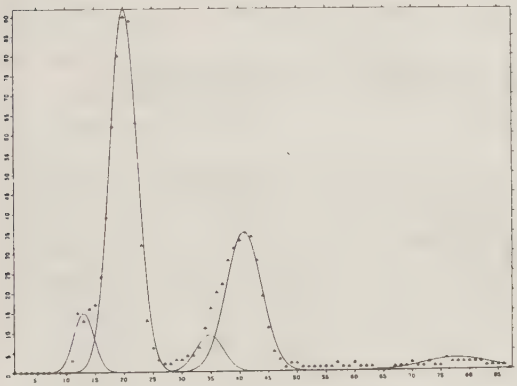


Abb. 13. Zwischenmaximum 2C-4C-Bereich.

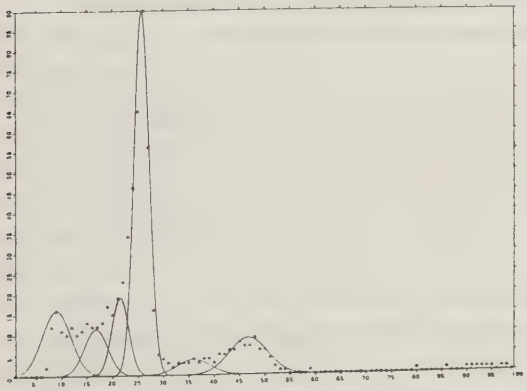


Abb. 14. Einzelmaximum im Bereich von 3C bei Kanal 37.

chend dem symmetrischen Verlauf des 4C-Gipfels. Bei einigen Computeranalysen, die dem Verlaufstyp der Abb. 10d entsprachen, fanden wir Einzelmaxima im Bereich von 3C (Abb. 14). Ihre Interpretation warf gewisse Probleme auf, die sich auf eine durch die Präparation verminderte Anfärbung der DNA, auf das Vorliegen von Syntheseker-nen oder Überlagerungen beziehen.

Die Computeranalyse ergab für die Verlaufstypen Abb. 11a-c ein eindeutig dem 8C-Kanalbereich zuzuordnendes Maximum (Abb. 12). Aber in einer Reihe von Fällen erhielten wir durch die Analyse auch im Kanalbereich von 6C ein Einzelmaximum. Bei nur geringfügigen Ausschlägen in einem dieser beiden Kanalbereiche wurde die gewählte hohe Analysenempfindlichkeit von 1% unterschritten. Analysen der verwaschenen Kurven waren nicht zu deuten.

3.5. Vergleich der Ergebnisse der Scanning- und der Impuls-Cytophotometrie

Um die aus der Computeranalyse der ICP-Diagramme gewonnenen Ergebnisse mit denen der Scanning-Histogramme vergleichen zu können, faßten wir die vom Computer angegebenen Flächenwerte (A%) der Einzelmaxima entsprechend den vom SMP bekannten DNA-Klassen zusammen. Bei diesem Vergleich der Ergebnisse ergaben sich eine Reihe von Problemen. Sie betrafen vor dem 2C-Gipfel liegende Schuttgipfel, sowie Maxima im Bereich von 3C und 6C. Weiterhin war die Abgrenzung von nichtmyocardialen 2C-Kernen gegen die myocardialen 2C-Kerne problematisch, da sie zusammen im 2C-Maximum des ICP in Erscheinung traten.

Im Bereich vor dem dominierenden Einzelmaximum der 2C-Klasse mußten wir vorhandene andere Einzelmaxima gegen den Schuttgipfel abgrenzen (Abb. 14). Wir ordneten die Maxima der 2C-Klasse zu, deren x-Werte größer als der mittlere x-Wert zwischen $x_{max\ C}$ und $x_{max\ 2C}$ waren.

Im Bereich zwischen der 2C- und der 4C-Klasse ergab sich die Frage, ob man Einzelmaxima von einer möglichen Syntheseklasse im Be-

reich von 3C abgrenzen könnte (Abb. 14). Zählte man nur die Einzelmaxima der 3C-Syntheseklasse, deren x-Werte genau zwischen dem 2C- und dem 4C-Maximum lagen, so ergaben sich aus der Computeranalyse folgende Werte: 15% der hypertrophierten Kinderherzen zeigten 2,5 ± 1,0% derartiger Synthesewerte, 18% der hypertrophierten Erwachsenenherzen enthielten 3,2 ± 1,6% und 23% der normalgewichtigen Erwachsenenherzen 5,6 ± 1,7% Synthesewerte. Die Scanning-Histogramme zeigten jedoch nur bei je einem hypertrophierten Erwachsenen- (Tab. 2, Nr. 6) und einem Kinderherzen (Tab. 1, Nr. 4) vier bzw. 1 Kern im 3C-Bereich. Die widersprüchlichen Ergebnisse im SMP und ICP (s. Kap. 4.3.3) sprechen gegen eine Wertung dieser Einzelmaxima als 3C-Syntheseklasse. Deshalb zählten wir alle Einzelmaxima vor $x_{max\ 3C}$ der 2C-Klasse, Einzelmaxima größer als $x_{max\ 3C}$ der 4C-Klasse zu.

Das Einzelmaximum im Bereich einer 6C-Klasse war in den ICP-Diagrammen immer eindeutig zuzuordnen und trat bei etwa der Hälfte der hypertrophierten Kinderherzen (44%) und normalgewichtigen Erwachsenenherzen (50%) sowie 18% der hypertrophierten Erwachsenenherzen mit etwa gleicher Häufigkeit von 4,0 ± 1,5% bzw. 3,5 ± 2,2% und 3,4 ± 2,0% auf. In den Scanning-Histogrammen fanden sich jedoch 6C-Kerne bei hypertrophierten Kinderherzen (11%) in nur 1,3 ± 0,6%, bei hypertrophierten Erwachsenenherzen (8%) in 4,0 ± 2,7% und bei normalgewichtigen Erwachsenenherzen (14%) in 1,0 ± 0%. PFITZER (1971) fand bei normalgewichtigen Herzen 0,18% 6C- und 12C-Kerne, bei hypertrophierten Erwachsenenherzen das vier- bis siebenfache.

Die Tab. 1 - 3 zeigen die Ergebnisse der SMP- und ICP-Methode nach Zuordnung der Einzelmaxima zu den DNA-Klassen. Bei allen Messungen hypertrophierter und normalgewichtiger Erwachsenenherzen waren die Prozentwerte für die 2C-Klasse im ICP deutlich höher als im SMP. Entsprechend niedriger waren sie für die 4C- und 8C-Klasse. Die Ursache für diese Differenz zwischen ICP- und SMP-Ergebnissen sahen wir in der Tatsache, daß das ICP nicht nur die 2C-Myocardkerne, sondern auch die anderen im Herzmuskelgewebe vorhandenen 2C-Kerne von Fibrocyten, Endothelzellen, Leukocyten und monocytären Zellen registrierte. Diese Überlegung erlaubt mit Hilfe der Scanningwerte für die 2C-, 4C- und 8C-Klasse für jede Messung den Anteil der

Myocardkerne am 2C-Gipfel des ICP-Histogramms zu berechnen (Abb. 15).

Abb. 15. Rechenbeispiel für die Berechnung von Myocardanteil am 2C-Gipfel und Vergleich der ICP-Werte und der SMP-Werte (Werte des Falles Nr. 2, Tab. 3).

Flächenwerte (A)	A_{2C}	A_{4C}	A_{8C}
der Computeranalyse	671,5	359,8	48,2
zugehörige ICP-Werte (%)	62,3	33,3	4,5
zugehörige SMP-Werte (%)	35,0	57,0	8,0

Berechnung des Myocardanteils am 2C-Gipfel des ICP:

$$\frac{A_{4C} + A_{8C}}{57\% + 8\%} = \frac{359{,}8 + 48{,}2}{65\%} = \frac{408}{65\%} \qquad \frac{x}{35\%}$$

$x = 219{,}7$ und damit 32,7% der Fläche A_{2C} (671,5).

Die Berechnung des Verhältnisses nichtmyocardialer 2C-Kerne zu myocardialen 2C-Kernen (Tab. 1 - 3) ergab für die linken Ventrikel von hypertrophierten Kinderherzen mit 1,6 ± 1,9 den niedrigsten Wert. Dagegen betrugen die Mittelwerte der Quotienten von nichtmyocardialen 2C-Kernen zu 2C-Myocardkernen für die rechten Ventrikel der hypertrophierten Kinderherzen 2,7 ± 1,9 , für die hypertrophierten Erwachsenenherzen links 7,2 ± 6,3 , rechts 4,6 ± 4,3 und für die normalgewichtigen Erwachsenenherzen links 4,8 ± 5,3 , rechts 2,4 ± 1,7.

Die Abb. 16a,b zeigen die Korrelation zwischen relativem Herzgewicht und dem Verhältnis nichtmyocardialer 2C-Kerne pro myocardialem 2C-Kern im linken und rechten Ventrikel von hypertrophierten und normalgewichtigen Erwachsenenherzen.

Wie Auszählungen der Bindegewebskerne in den Sedimentationspräparaten zeigten, bestand keine Korrelation zwischen nichtmyocardialem 2C-Anteil und der Anzahl der in den Sedimentationspräparaten gefundenen Fibrocyten.

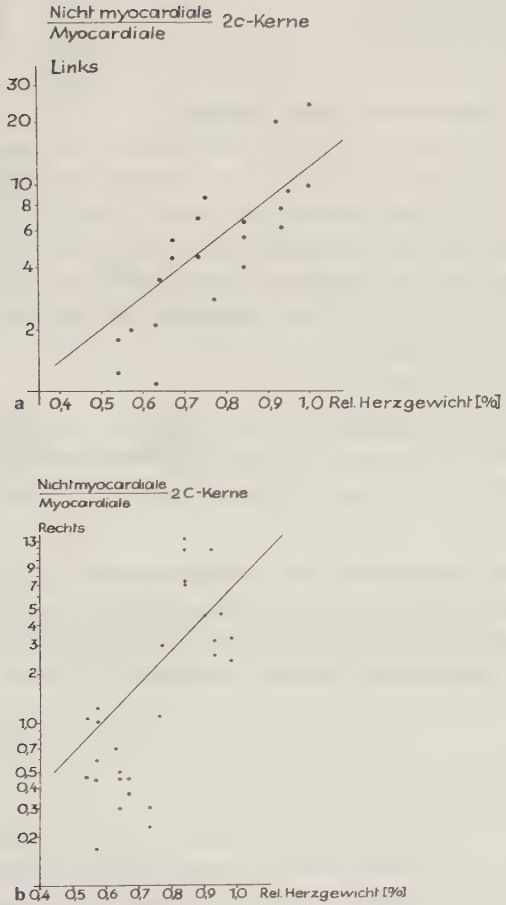


Abb. 16. Korrelation zwischen relativem Herzgewicht (%) und dem Verhältnis nichtmyocardialer 2C-Kerne pro myocardialem 2C-Kern im linken und rechten Ventrikel hypertrophierter und normalgewichtiger Erwachsenenherzen.

3.6. Spezielle Meßergebnisse

3.6.1. Herzen mit angeborenen Mißbildungen

Von insgesamt 17 untersuchten Herzen mit angeborenen Mißbildungen konnten wir in allen Fällen Doppelmessungen im ICP und SMP durchführen (Tab. 1). Neben dem Körpergewicht ermittelten wir bis auf 7 Fälle auch das absolute und relative Herzgewicht (s. S. 17). In Fällen mit im ICP höherem 2C-Gipfel berechneten wir den Anteil der Myocardkerne sowie das Verhältnis nichtmyocardialer 2C-Kerne zu myocardialen 2C-Kernen (Abb. 15).

Mit Hilfe der SMP-Werte konnten wir in allen von uns untersuchten Kinderherzen und von den in Tab. 1 aufgeführten früher publizierten Fällen (PFITZER, 1971) den relativen DNA-Gehalt pro Kern feststellen.

Im Hinblick auf die Problematik der ICP-Ergebnisse (s. S. 24) und fehlender ICP-Ergebnisse bei den früher publizierten Fällen (PFITZER, 1971), stützten wir unsere vergleichenden Betrachtungen in diesem Kapitel vorwiegend auf die Ergebnisse im SMP.

3.6.1.1. Fallotsche Tetralogie

Unter Einbeziehung der früher publizierten Fälle (PFITZER, 1971) konnten hier 10 Fälle zwischen 2 und 40 Jahren verglichen werden, davon 8 Fälle alterskontinuierlich von 2 bis 9 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 6 Jahren.

Von den Fällen mit Meßergebnissen aus beiden Ventrikeln zeigte der Vergleich der SMP-Werte aus linkem und rechtem Ventrikel eines sechsjährigen Jungen (Tab. 1, Nr. 5) eine deutliche Polyploidie nur des rechten Ventrikels mit 61% diploiden, 27% tetraploiden, 9% oktoploiden Kernen und drei Kernen im 16C-Bereich. Entsprechend dem hypoplastischen linken Ventrikel fanden wir hier 96% 2C-Kerne und 4% 4C-Kerne. Vergleichbare Werte wurden für den rechten Ven-

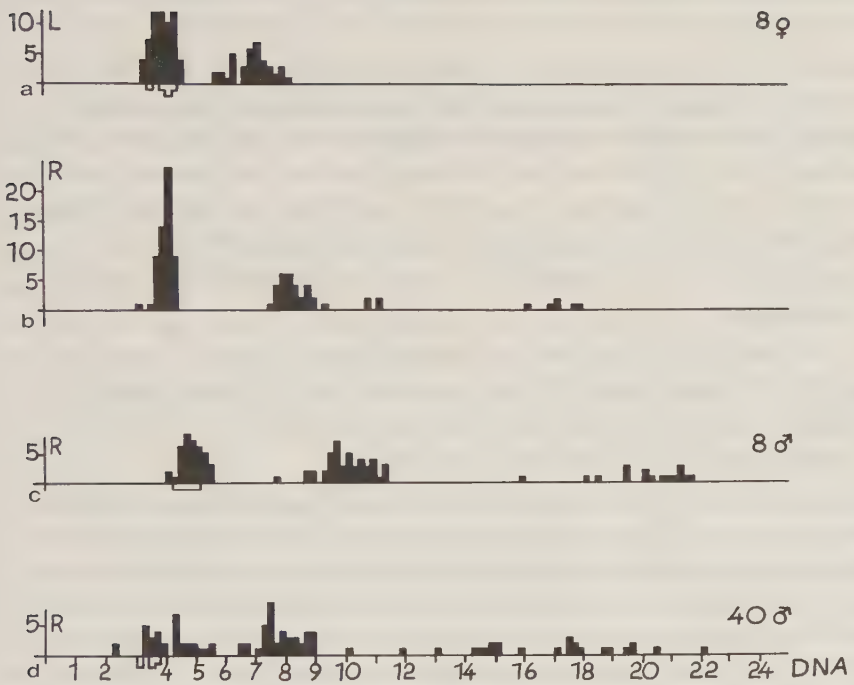


Abb. 17. SMP-Histogramme von 3 Herzen mit Fallotscher Tetralogie.

trikel eines achtjährigen Mädchens (Tab. 1, Nr. 6, Abb. 17b) mit 60% diploiden, 34% tetraploiden und 6% oktoploiden Kernen erhoben. Allerdings ergaben die Messungen links (Abb. 17a) mit 61% diploiden und 39% tetraploiden Kernen eine etwa gleich stark ausgeprägte Polyploidie wie die normaler Kinderherzen in diesem Alter (PFITZER, 1971, Tab. 1).

Bei einem früheren Befund (Tab. 1, Nr. 2) war der Polyploidisierungsgrad im rechten Ventrikel schon im Alter von vier Jahren deutlicher ausgeprägt als in den beiden Fällen Nr. 5 und 6 unserer Serie. Die Polyploidie des rechten Ventrikels eines achtjährigen Jungens (Tab. 1, Nr. 7, Abb. 17c) erreichte mit 44% tetraploiden und 16% oktoploiden Kernen das Ausmaß dieses Befundes. Dabei zeig-

te das SMP-Histogramm sowohl im Bereich von 3C als auch von 6C jeweils einen Kern.

In dem rechten Ventrikel eines 40jährigen Mannes (Tab. 1, Nr. 10, Abb. 17d) mit einer hochgradigen Rechtshypertrophie (Wanddicke 13 mm) registrierten wir im SMP-Histogramm etwa 33% diploide, 43% tetraploide, 23% oktoploide und 1% Kerne in der 16C-Klasse, wobei die breite Streuung der Werte auffiel. Im Vergleich zu den früheren Befunden im Alter von 9 bis 19 Jahren (Tab. 1, Nr. 8 und 9) war die Polyploidie in diesem Fall trotz des hohen Alters schwächer ausgeprägt.

Der linke Ventrikel eines sechsjährigen Jungens (Tab. 1, Nr. 4) zeigte mit 74% diploiden, 23% tetraploiden und 3% oktoploiden Kernen eine mit dem Fall eines fünfjährigen Jungens (Tab. 1, Nr. 3) fast identische Verteilung der DNA-Klassen.

Versucht man diese Unterschiede zu interpretieren und vergleicht man den relativen DNA-Gehalt/Kern im linken und rechten Ventrikel der Herzen mit Fallotscher Tetralogie im Alter von 2 bis 8 Jahren (Tab. 1), so ergaben die linken Ventrikel der Fälle Nr. 1 - 6 bei einem relativen DNA-Gehalt zwischen 2,1 und 2,8 einen Mittelwert von 2,6 ± 0,3 , die rechten Ventrikel der Fälle Nr. 1 - 3 und Nr. 5 - 7 bei einem relativen DNA-Gehalt zwischen 2,6 und 4,4 einen Mittelwert von 3,6 ± 0,7.

Das Herz eines 9jährigen Mädchens (Tab. 1, Nr. 8) mit einem für das Alter außerordentlich hohem Herzgewicht von 381 g wies sowohl im linken mit 5,6 als auch im rechten Ventrikel mit 9,6 einen höheren relativen DNA-Gehalt auf als die nur ein Jahr jüngeren Herzen Nr. 6 und 7 mit einem im Falle des 8jährigen Jungens altersentsprechenden Herzgewicht von 165 g. Im Alter von 19 Jahren (Tab. 1, Nr. 9) zeigten der linke und rechte Ventrikel mit 5,2 bzw. 5,3 gleich hohe relative DNA-Gehalte.

3.6.1.2. Transposition der großen Gefäße

Von dieser Fehlbildung standen insgesamt Daten von 16 Fällen im Alter zwischen 2 Tagen und 30 Jahren zur Verfügung, von denen 15

Fälle von 2 Tagen bis 6 Jahren mit einem Durchschnittsalter von einem Jahr alterskontinuierlich verglichen werden konnten.

Das SMP-Histogramm eines zwei Tage alten Jungens (Tab. 1, Nr. 11) ergab für den linken Ventrikel 97% 2C- und 3% 4C-Kerne. Es entsprach damit dem Befund bei einem vier Tage alten Mädchen (Tab. 1, Nr. 12) in der Arbeit von PFITZER (1971) und der Entwicklung in gesunden Herzen.

Bei der Messung des Herzens eines acht Tage alten Jungens (Tab. 1, Nr. 13, Abb. 18a,b) fanden wir im rechten Ventrikel mit dem SMP 8% und übereinstimmend mit dem ICP 10% 4C-Kerne. Im linken Ventrikel registrierten wir mit dem SMP nur 2C-Kerne.

Von dem Herzen eines 25 Tage alten Jungens (Tab. 1, Nr. 14) konnten wir nur den rechten Ventrikel im SMP und ICP messen. Das SMP-Histogramm des rechten hypertrophischen Ventrikels (Wanddicke 5 mm) ergab 86% 2C- und 14% 4C-Kerne. Die gleichen Werte für die 2C- bzw. 4C-Fraktion ergab die Computeranalyse der ICP-Kurve des linken Ventrikels. Diese Werte sind unter dem Vorbehalt der methodischen Problematik des ICP mit denen eines einen Monat alten Mädchens (Tab. 1, Nr. 16) aus der Arbeit von PFITZER (1971) und eines anderen einen Monat alten Mädchens unserer Serie (Tab. 1, Nr. 15, Abb. 18c,d) vergleichbar. Auch hier wies der rechte Ventrikel mit 19% 4C-Kernen noch geringe Polyploidie auf. Demgegenüber war der linke Ventrikel mit 34% tetraploiden und 4% oktoploiden Kernen bereits deutlich polyploidisiert. Dies unterscheidet diesen Fall von dem erwähnten eines gleichaltrigen Mädchens (Tab. 1, Nr. 16). Als Ursache für diese außergewöhnlich frühzeitige Polyploidisierung des linken Ventrikels nahmen wir die zusätzliche Fehlbildung einer Hypoplasie der transponierten A. pulmonalis an.

Im Vergleich zu den genannten Fällen Nr. 14 - 16 zeigten die SMP- und ICP-Histogramme des rechten Ventrikels eines fünf Wochen alten Jungens (Tab. 1, Nr. 17) mit 5% bzw. 8% 4C-Kernen keine Zeichen der vorzeitigen Polyploidisierung. Die Analyse des ICP-Histogramms des linken Ventrikels ergab den nur wenig höheren Wert von 10% 4C-Kernen.

Die Polyploidisierung des rechten Ventrikels eines dreijährigen Jungens (Tab. 1, Nr. 23, Abb. 18e,f) war, im Vergleich zu den

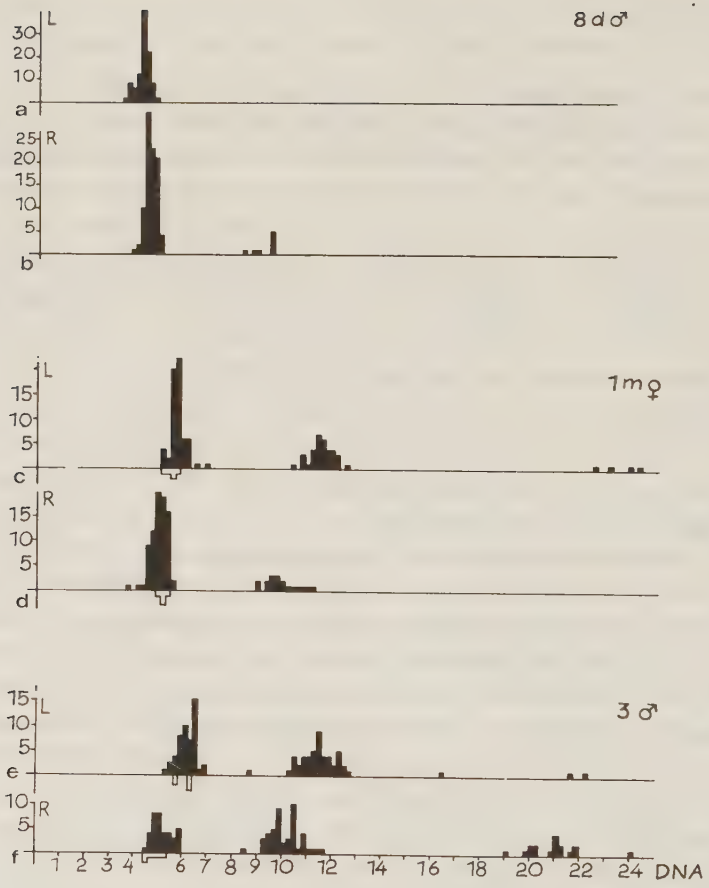


Abb. 18. SMP-Histogramme von 3 Herzen mit TGA.

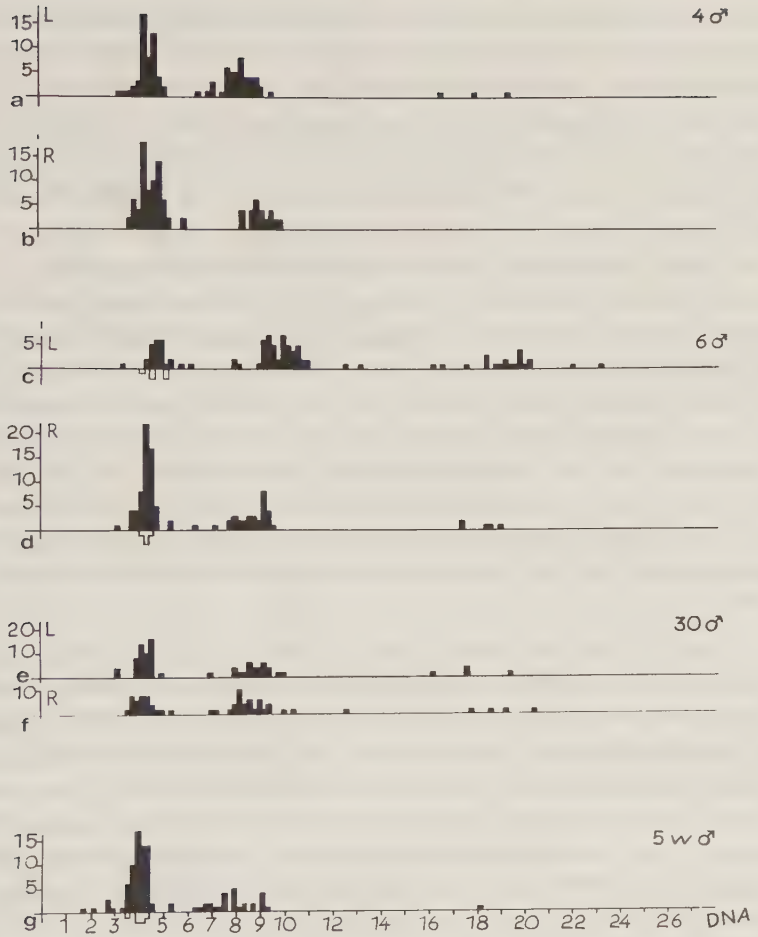


Abb. 19. SMP-Histogramme von 4 Herzen mit TGA.

beiden älteren Fällen Nr. 24 und 25, mit 46% tetraploiden und 17% oktoploiden Kernen besonders stark ausgeprägt. Erklärung für diese deutliche Polyploidie war eine hochgradige Aortenisthmusstenose. Die Polyploidie im SMP-Histogramm des linken Ventrikels mit je 48% Kernen im 2C- und 4C-, 1% im 3C- und 6C- und 2% im 8C-Bereich erklärte sich durch den Eingriff eines Banding der A. pulmonalis im Alter von einem Jahr, also zwei Jahre vor dem Tod.

Die SMP-Histogramme der rechten Ventrikel eines vierjährigen (Tab. 1, Nr. 24, Abb. 19a,b) und eines sechsjährigen Jungens (Tab. 1, Nr. 25, Abb. 19c,d) wiesen mit 28% bzw. 32% tetraploiden und 5% oktoploiden Kernen im Fall Nr. 25 eine schwächere Polyploidisierung auf als die linken Ventrikel. Die SMP-Histogramme zeigten im Falle des vierjährigen 45% tetraploide und 3% oktoploide Kerne und im Falle des sechsjährigen Jungens 51% tetraploide, 22% oktoploide und je 1% Kerne im 16C- und 32C-Bereich, was zu diesem Zeitpunkt annähernd der Polyploidisierung normaler Kinderherzen entspricht (PFITZER, 1971, Tab. 1). Einziger im Vergleich zu anderen TGAs auffälliger Befund war im Falle des Sechsjährigen ein besonders großer VSD.

Im Falle eines 30jährigen Mannes (Tab. 1, Nr. 26, Abb. 19e,f) mit einem Herzgewicht von 615 g bei einem Körpergewicht von 48 kg, der in der postoperativen Phase nach einer Totalkorrektur nach MUSTARD an einer respiratorischen Insuffizienz bei Pneumonie und Allgemeininfekten verstorben war, ergab die SMP-Messung des linken Ventrikels mit 54% diploiden, 38% tetraploiden und 8% oktoploiden Kernen eine schwächere Polyploidisierung als sie den in normalen Erwachsenenherzen (PFITZER, 1971) ermittelten durchschnittlichen Werten entspricht. Das Verhalten der DNA-Klassenverteilung im rechten Ventrikel war mit 42% diploiden, 48% tetraploiden, 8% oktoploiden und 2% Kernen im 6C-Bereich in diesem Fall nicht mit dem pathologischen Befund zu vereinbaren, der für eine extreme Belastung des rechten Ventrikels sprach. Vor der Operation waren bei der Herzkatheterisierung des rechten und linken Ventrikels Drücke von 125/0 bzw. 25/0 mm Hg, im rechten und linken Vorhof Drücke von 7/0 bzw. 6/0 mm Hg gemessen worden. Es lag ein sehr großer Vorhofseptumdefekt vor, und die A. pulmonalis zeigte einen Durchmesser von 7 cm.

Die DNA-Klassenverteilung des linken Ventrikels des neun Monate alten Jungens (Tab. 1, Nr. 22) entsprach im SMP-Histogramm mit 89% 2C-, 10% 4C-Kernen und 1% Kernen im 8C-Bereich der eines fünf Monate alten Mädchens (Tab. 1, Nr. 21) in der Arbeit von PFITZER.

Als Ergänzung zu den Messungen an Herzen mit TGA führen wir hier zwei Sonderfälle auf, die im pathologischen Sektionsgut eine Rarität darstellen. Das Herz eines zwei Monate alten Jungens (Tab. 1, Nr. 19, Abb. 20a,b) wies bei rudimentär angelegtem rechten Ventrikel einen gemeinsamen Ventrikel für die transponierten großen Gefäße auf, wobei der Truncus pulmonalis ektatisch war. Mit 92% 2C- und 8% 4C-Kernen entsprach die DNA-Klassenverteilung der wesentlich jüngerer Herzen mit TGA (Tab. 1, Nr. 11 und 13) bzw. dem Normalbild in diesem Alter. Vergleicht man diese SMP-Werte mit denen eines fünf Wochen alten Jungens (Tab. 1, Nr. 18, Abb. 19g) mit einem Cor triloculare biatrium kombiniert mit einer TGA, bei dem neben offenen fetalen Blutwegen eine Hypoplasie des Aortenbogens vorlag, so findet man mit 72% diploiden, 27% tetraploiden und 1% oktoploiden Kernen eine beginnende vorzeitige Polyploidisierung. Als Erklärung hierfür läßt sich die durch die Aortenhypoplasie bedingte Druckerhöhung heranziehen.

Bei der Betrachtung des relativen DNA-Gehaltes/Kern in linken und rechten Ventrikeln der Herzen mit TGA im Vergleich zu Herzen mit Fallotscher Tetralogie (s. S. 30) ergaben sich Unterschiede. Drei Herzen mit TGA (Tab. 1, Nr. 23 - 25), die bei einem Alter von 3 bis 6 Jahren mit der entsprechenden Altersgruppe der Herzen mit Fallotscher Tetralogie (Tab. 1, Nr. 1 - 6) vergleichbar waren, ergaben in den linken Ventrikeln einen durchschnittlichen relativen DNA-Gehalt von 3,7 ± 1,0 , der deutlich höher war als der altersentsprechender Herzen mit Fallotscher Tetralogie mit 2,6 ± 0,3. Dieser Unterschied war signifikant ($p < 0,01$). Die rechten Ventrikel der drei Herzen mit TGA zeigten mit einem durchschnittlichen relativen DNA-Gehalt von 3,2 ± 0,7 einen den Herzen mit Fallotscher Tetralogie mit 3,6 ± 0,7 vergleichbaren Wert.

In der Altersgruppe von 2 Tagen bis 9 Monaten, in der altersentsprechende Fälle von Herzen mit Fallotscher Tetralogie fehlten, ergaben die linken Ventrikel der Herzen mit TGA (Tab. 1, Nr. 11 - 13, 15, 16, 18 - 22) bei einem relativen DNA-Gehalt zwischen 2,0

und 2,9 einen Mittelwert von 2,3 ± 0,3 , die rechten Ventrikel von Herzen im Alter von 4 Tagen bis 5 Monaten (Tab. 1, Nr. 12 - 17, 20, 21) bei einem relativen DNA-Gehalt zwischen 2,1 und 3,2 einen Mittelwert von 2,5 ± 0,5.

3.6.2. Hypertrophierte Erwachsenenherzen

Von den insgesamt 22 untersuchten hypertrophierten Erwachsenenherzen führten wir bei 13 Herzen Doppelmessungen im SMP und ICP durch. Da in allen 13 Fällen der 2C-Gipfel im ICP höher war als im SMP, konnten wir den Anteil der Myocardkerne sowie das Verhältnis nichtmyocardialer 2C-Kerne zu myocardialen 2C-Kernen berechnen (Abb. 15). Bis auf einen Fall standen neben dem Körpergewicht auch das absolute und damit das relative Herzgewicht (s. S. 17) zur Verfügung. Mit Hilfe der SMP-Werte konnten wir in 15 Fällen den relativen DNA-Gehalt pro Kern errechnen.

Zur Beantwortung der hier besonders interessierenden methodischen Frage der Messung von Herzmuskelkernen mit dem Impuls-Cytophotometer, stützten wir unsere vergleichenden Betrachtungen auf die Ergebnisse im SMP.

Nach den Meßergebnissen unterschieden wir von den 15 im SMP untersuchten Herzen drei Gruppen:

1. Acht Hypertonieherzen mit hypertrophierten linken Herzen bei unauffälligen rechten Ventrikeln (Tab. 2, Nr. 1 - 8).
2. Vier Hypertonieherzen mit links und rechts hypertrophierten Herzen (Tab. 2, Nr. 16 - 19).
3. Drei Herzen mit idiopathischen Cardiomyopathien und einer Cardiomegalie bei Hypophysentumor (Tab. 2, Nr. 20 - 22).

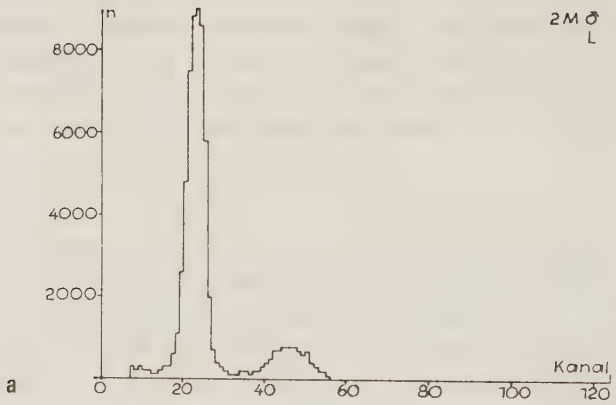
Zu 1.:
Der Mittelwert der 2C-Werte der linken Ventrikel der acht Herzen mit isolierter Linkshypertrophie bei ausgeprägter allgemeiner Arteriosklerose und Coronarsklerose war mit 26,9 ± 6,8% gegenüber nochmalgewichtigen Erwachsenenherzen mit 32,0 ± 3,7% 2C-Kernen (PFITZER, 1971) vermindert, was eine gesteigerte Polyploidisierung

anzeigt. Der Mittelwert der 2C-Werte der unauffälligen rechten Ventrikel entsprach mit 56,5 ± 11,1% dem Durchschnittswert bei normalgewichtigen Erwachsenenherzen mit 60,0 ± 4,5% (PFITZER, 1971). Dieser Unterschied in der Polyploidisierung zwischen linken und rechten Ventrikeln kommt auch durch den Mittelwert des relativen DNA-Gehaltes pro Kern zum Ausdruck, der in den linken Ventrikeln mit 4,2 ± 0,7 deutlich höher war als in den rechten mit 3,3 ± 0,8.

Zu 2.:
Auch der Mittelwert der 2C-Kerne der linken Ventrikel der vier beidseitig hypertrophierten Herzen entsprach mit 16,0 ± 5,2% einer gegenüber normalgewichtigen Herzen gesteigerten Polyploidisierung. In rechten Herzen waren entsprechend den Befunden einer Rechtshypertrophie ebenfalls die 2C-Werte mit 29,0 ± 5,7% deutlich reduziert. Sie entsprachen damit einer stärkeren Polyploidisierung als sie in rechten Ventrikeln normalgewichtiger Erwachsenenherzen auftraten. Der Mittelwert des relativen DNA-Gehaltes pro Kern betrug in den linken Ventrikeln 5,8 ± 1,1 und in den rechten Ventrikeln 5,2 ± 1,8.

Zu 3.:
Einen auffälligen Befund ergab die SMP-Messung des Herzens eines 18jährigen Mannes mit idiopathischer Cardiomyopathie (Tab. 2, Nr. 20). Im linken Ventrikel maßen wir 68% diploide, 11% tetraploide, 11% oktoploide und 10% der Kerne in der 16C-Klasse, im rechten Ventrikel 79% diploide, 14% tetraploide, 5% oktoploide und 2% der Kerne in der 16C-Klasse. Somit zeigten beide Ventrikel trotz eines Herzgewichtes von 595 g bei beidseitiger konzentrischer Hypertrophie im Vergleich zu normalgewichtigen Erwachsenenherzen einen erhöhten Anteil an 2C-Kernen und nur eine in der 16C-Klasse um 7% links bzw. 2% rechts geringfügig gesteigerte Polyploidisierung. Da bei der SMP-Messung keine nichtmyocardialen Kerne registriert wurden, muß es sich im 2C-Bereich um Myocardkerne handeln.

Das Herz eines 50jährigen Mannes (Tab. 2, Nr. 21, Abb. 21c,d) wies eine idiopathische hypertrophische subvalvuläre Aortenstenose (IHSS) mit ausgeprägter konzentrischer Linkshypertrophie auf. Die Dicke der linken Kammerwand betrug 22 mm, die der rechten



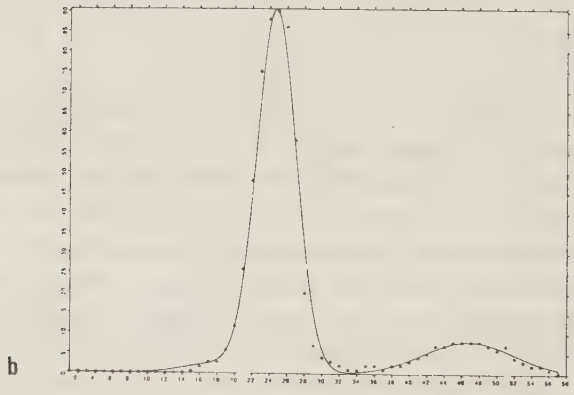


Abb. 20. ICP-Diagramm (a) und Diagramm der Computer-analyse (b) eines Kinderherzens mit gemeinsamen Ventrikel für die transponierten großen Gefäße.

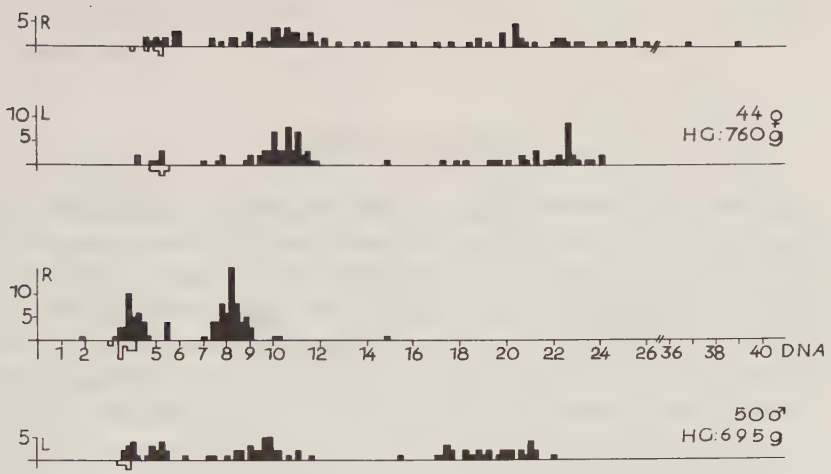


Abb. 21. SMP-Histogramme von 2 hypertrophierten Erwachsenenherzen.

4 mm. Im SMP zeigten beide Ventrikel einen gegenüber normalgewichtigen Erwachsenenherzen deutlich gesteigert Polyploidie mit links 34% tetraploiden, 34% oktoploiden und 6% der Kerne in der 16C-Klasse bzw. 61% tetraploiden und 1% der Kerne in der 8C-Klasse rechts.

Im Falle einer 44jährigen Frau (Tab. 2, Nr. 22, Abb. 21a,b) bestand bei eosinophilem Adenom des Hypophysenvorderlappens mit Akro- und Splanchnomegalie auch eine mit 750 g ausgeprägte Herzhypertrophie. Die Wanddicke der stark dilatierten Ventrikel betrug links 22 mm und rechts 8 mm. Diesem Befund entsprechend zeigte das SMP-Histogramm des linken Ventrikels bei ausgeprägter Streuung der Werte nur 7% diploide Kerne, 53% tetraploide, 37% oktoploide und 3% der Kerne in der 16C-Klasse. Das Muster des rechten Ventrikels unterschied sich davon kaum und wies 46% tetraploide, 37% oktoploide und 2% Kerne in der 16C-Klasse auf. BLESSING et al. (1976) fanden im linken Ventrikel eines 34jährigen Mannes mit einem Herzgewicht von 812 g bei eosinophilem Adenom mit Akromegalie mit 4% diploiden, 31% tetraploiden, 46% oktoploiden, 13% Kernen in der 16C-, 5% in der 32C- und 1% Kernen in der

12C-Klasse eine unserem Fall vergleichbare Polyploidisierung.

3.6.3. Normalgewichtige Erwachsenenherzen

Die Ergebnisse der SMP-Messungen an fünf normalgewichtigen Erwachsenenherzen im Alter von 18 bis 61 Jahren und mit Herzgewichten zwischen 290 g und 370 g zeigten auch die von PFITZER (1971) festgestellte individuelle Variationsbreite des 2C-Wertes von 6% (Tab. 3, Nr. 6) bis 48% (Tab. 3, Nr. 3) für die linken Ventrikel und von 28% (Tab. 3, Nr. 6) bis 72% (Tab. 3, Nr. 3) für die rechten Ventrikel. Die Mittelwerte der fünf Messungen betrugen 26,0% für die linken und 49,2% für die rechten Ventrikel. In allen fünf Fällen war im linken Ventrikel ein deutlich höherer Polyploidisierungsgrad als im rechten Ventrikel gemessen worden.

Der Mittelwert des relativen DNA-Gehaltes pro Kern war in den linken Ventrikeln entsprechend der stärkeren Polyploidie mit 3,8 ± 0,5 höher als in den rechten Ventrikeln mit 3,0 ± 0,3.

4. DISKUSSION

4.1. Isolation von Myocardkernen

Um den DNA-Gehalt von Myocardkernen im Photometer zu messen, muß man sie aus ihrem dreidimensionalen Zellverband lösen. Verwendet man Schnittpräparate (SANDRITTER und SCOMAZZONI, 1964), kann man nicht ausschließen, daß besonders die größeren Kerne angeschnitten werden. Eine weitere Methode ist die von PFITZER und CAPURSO (1970) angewandte Abstrichtechnik. FISCHER et al. (1970) lösten die Zellkerne aus dem Gewebe, indem sie das Gewebe homogenisierten. Das Cytoplasma wird in physioligischer Kochsalzlösung zerschlagen. Mit dieser Methode sollen 95% der Myocardkerne vollständig erhalten bleiben, was jedoch nicht den Erfahrungen der Düsseldorfer Arbeitsgruppe entspricht.

Will man den gesamten DNA-Gehalt der Myocardzellen messen, also auch Kernreihen und Doppelkerne innerhalb einer Zelle auffinden, so muß man die Myocardzellen vereinzeln. SCHNEIDER und PFITZER (1972) isolierten Myocardzellen mit 35%iger Kalilauge. Ein großer Nachteil dieser Methode ist die schwer kontrollierbare Mazeration von Cytoplasma und Kern. HILFER und BROWN (1971) stellten fest, daß im Vergleich mit Tetraphenylbor, Pronase oder Trypsin und EDTA Collagenase die größte Effektivität bei der Isolation von Schilddrüsen- und Herzgewebe erreicht. Weitere Arbeiten über dieses Thema liegen inzwischen vor (BOJAR et al., 1976). Obwohl bei der von uns verwandten Methode der enzymatischen Isolierung von Myocardzellen mit 0,1%iger Collagenase Zellfragmente entstanden, war doch die Ausbeute an isolierten Kernen so groß, daß wir das gewonnene Material sowohl für Messungen mit dem SMP als auch für Messungen mit dem ICP weiterverarbeiten konnten.

4.2. Die Methode der Impuls-Cytophotometrie

Das ICP wurde ursprünglich verwendet, um Messungen an Tumorpopulationen in Ergüssen durchzuführen. SCHUMANN et al. (1971) benutz-

ten das ICP als Erste, um die DNA der Zellkerne in soliden Hauttumoren zu messen.

Für die Messung des DNA-Gehaltes von Myocardkernen wollten wir die Vorteile des ICP nutzen, die in der Messung großer Zellzahlen in kurzer Zeit, keiner subjektiven Bevorzugung großer, höherploider Kerne und in der Erfassung nekrotischen Materials bestehen. Dabei mußten wir Nachteile in Kauf nehmen: Bei der Messung im ICP wurde im 2C-Bereich nicht zwischen Myocard- und Stromagewebskernen oder kernhaltigen Blutzellen unterschieden (s. Kap. 4.3). Auf Grund der fehlenden morphologischen Kontrolle der Kernstruktur blieben Zellminderheiten, wie z.B. Doppelkerne in einer Zelle, unberücksichtigt (PFITZER, 1978). Außerdem fanden wir mit dem ICP keine Kerne der hohen Polyploidieklassen 16C oder 32C, die bei den vergleichenden Messungen mit dem SMP in einigen Präparaten zu finden waren.

4.3. Mögliche Ursachen unterschiedlicher Ergebnisse der SMP- und und ICP-Methode

4.3.1.

Das ICP konnte bei der Messung im 2C-Bereich nicht zwischen Myocard- und Bindegewebskernen differenzieren. Dies war unserer Meinung nach der Hauptgrund für die bei allen hypertrophierten und normalgewichtigen Erwachsenenherzen im ICP höheren 2C-Werte als im SMP (s. S. 25). Der errechnete Anteil der nichtmyocardialen 2C-Kerne an dem 2C-Gipfel im ICP variierte, was in den unterschiedlichen Werten für den Quotienten von nichtmyocardialen 2C-Kernen pro myocardialem 2C-Kern zum Ausdruck kam. Dabei waren besonders die unterschiedlichen Werte zwischen linken und rechten Ventrikeln sowie zwischen hypertrophierten Kinderherzen, hypertrophierten und normalgewichtigen Erwachsenenherzen auffällig. In den linken Herzen von Erwachsenen- und Kinderherzen war der Anteil nichtmyocardialer 2C-Kerne immer größer als in den rechten Herzen. Die höchsten Werte fanden sich in hypertrophierten Erwachsenenherzen. Auch wenn wir in unseren Präparaten keine Korrelation zwischen nichtmyocardialem 2C-Anteil und Bindegewebskernen feststel-

len konnten (s. S. 26), führt der Vergleich mit den Ergebnissen von KNIERIEM (1964), der den Bindegewebsgehalt des menschlichen Herzmuskels mit dem Integrationsmikroskop untersuchte, teilweise zu entsprechenden Aussagen. Dabei muß aber berücksichtigt werden, daß auf Grund des unterschiedlichen Materials und der Methodik ein direkter Vergleich der angegebenen Werte aus der Arbeit von KNIERIEM und unserer Arbeit nicht möglich ist.

KNIERIEM fand in linken Herzen und Septen von sechs hypertrophierten Erwachsenenherzen mit 13,9% einen signifikant höheren Bindegewebsanteil als in linken Ventrikeln von normalgewichtigen Erwachsenenherzen mit Werten zwischen 9,2 - 9,5%. Unsere Werte für das Verhältnis nichtmyocardialer 2C-Kerne zu myocardialem 2C-Kern zeigen mit 7,2 bzw. 4,8 (s. S. 26) eine ähnliche Relation. Für rechte Ventrikel normalgewichtiger Erwachsenenherzen gab KNIERIEM einen mittleren Bindegewebsanteil von 11,3% , für rechte Ventrikel linkshypertrophierter Herzen einen von 10,8% an. Wir berechneten ein Verhältnis nichtmyocardialer zu myocardialen 2C-Kernen für rechte Ventrikel normalgewichtiger Herzen von 2,4 ± 1,7. Für rechte Ventrikel hypertrophierter Erwachsenenherzen ergab sich bei Differenzierung in Herzen mit isolierter Linkshypertrophie ein Wert von 1,3 ± 1,1 (Tab. 2, Nr. 1 - 8), für hypertrophierte Herzen mit begleitender Rechtshypertrophie (Tab. 2, Nr. 16 - 19) ein Wert von 7,4 ± 4,3. Der physiologischerweise hohe Fettgehalt in der rechten Kammerwand soll für den hohen Bindegewebsanteil in rechten Ventrikeln normalgewichtiger Herzen verantwortlich sein (KNIERIEM, 1964). Unsere sehr niedrigen Werte für unbelastete rechte Ventrikel könnten erklärt werden mit einem höheren Alter des kollagenen Bindegewebes im rechten Herzen und dem damit geringeren Kerngehalt, der bei der Methode von KNIERIEM nicht berücksichtigt worden war.

Zusammenfassend können wir festhalten, daß der Anteil nichtmyocardialer 2C-Kerne entsprechend dem Bindegewebsanteil am menschlichen Herzgewebe in hypertrophierten linken als auch in rechten Ventrikeln erwachsener Herzen vermehrt ist. Eine Abhängigkeit von Alter und absolutem Herzgewicht konnten KNIERIEM (1964) und wir dabei nicht feststellen. Dagegen weist die Abhängigkeit vom relativen Herzgewicht (Abb. 16) auf einen noch nicht näher definier-

baren zusätzlichen Faktor hin, der in belasteten Herzen sowohl Einfluß auf die Polyploidisierung (Abb. 8) als auch auf den Anteil nichtmyocardialer 2C-Kerne ausübt. Mit diesem Faktor könnte das somatotrope Hormon (STH) gemeint sein.

4.3.2.
Ursache für unterschiedliche Ergebnisse bei den Rückrechnungsversuchen (Abb. 15) war in den meisten Fällen ein im ICP größerer 4C/8C-Quotient als im SMP. Durch den ohnedies geringen Prozentsatz der 8C-Kerne im ICP fallen Präparationsverluste durch Fragmentierung stärker ins Gewicht.

Eine andere Erklärung sahen wir zunächst in der Maschenweite der Filter (70 µ), durch die die Kernzsuspensionen vor der Messung im ICP filtriert worden waren (s. S. 4). SCHNEIDER und PFITZER (1972) fanden für die 8C-Kerne unabhängig von Alter und Gewicht in Ausstrichen eine Fläche von 200,2 ± 11,1 μ^2. Die individuelle Schwankung bei den 8C-Kernen betrug 123,8 - 297,6 μ^2. In den Sedimentationspräparaten war bei einem Teil der Myocardkerne noch ein deutlicher Cytoplasmasaum vorhanden. Wie PFITZER (1971) zeigte, nehmen die Myocardkerne außerhalb der Zelle Kugelform an. Bei einer Oberfläche von ca. 400 μ^2 ergibt sich ein durchschnittlicher Durchmesser von 11,3 µ. Auch bei Berücksichtigung der großen individuellen Schwankungen der Kerngröße und des Cytoplasmasaums erschien es uns unwahrscheinlich, daß deshalb 8C-Kerne in den Filterporen zurückgehalten würden. Höherploide Kerne (16C, 32C) dürften hingegen in den Filterporen abgefangen worden sein. Die Tatsache, daß das ICP in keinem der untersuchten Fälle 16C- oder 32C-Kerne registriert hatte (s. S. 22), spricht für diese Erklärung.

Eine Fehlerquelle von Seiten der SMP-Methode ergab sich aus der nur schwer auszuschließenden subjektiven Bevorzugung der 8C- gegenüber den 4C-Kernen. Dieser mögliche Stichprobenfehler bei der Messung im SMP dürfte aber ebenfalls nicht allein für die zum Teil großen Unterschiede der 4C/8C-Quotienten verantwortlich gewesen sein.

4.3.3.
Widersprüche zwischen SMP- und ICP-Methode ergaben sich ferner durch die Registrierung von Einzelmaxima in den Kanalbereichen

möglicher 3C- und 6C-Syntheseklassen (s. S. 22). ADLER (1976) fand bei Scanning-Messungen in Fetenherzen bis zu 6% 3C-Kerne. Auf Grund der starken Streuung in diesem Meßbereich nahm er an, daß es sich um Kerne in verschiedenen Stadien der S-Phase handelt. Postnatal fand PFITZER (1971) bei Kinderherzen nur noch vereinzelt 3C-Kerne, was auch Ergebnissen von ADLER (1976) und den SMP-Messungen in unserer Arbeit entspricht (s. S. 25). Als Erklärung für Gipfel exakt im Bereich von 3C könnte man auch annehmen, daß die beiden elterlichen Genome, analog zum spätsynthetisierenden zweiten x-Chromosom, die DNA zu verschiedenen Zeitpunkten replizieren. Die aneuploiden Werte zwischen 2C und 4C könnten ferner entstehen, wenn neu synthetisierte DNA nicht stabil fixiert ist und bei der Verarbeitung der Präparate hydrolysiert wird. Die Maxima im Bereich einer 3C-Syntheseklasse, die durch die Computeranalyse geliefert wurden, stehen zu den besprochenen SMP-Befunden im Widerspruch. Es läßt sich nicht abschätzen, in welchem Maß das Analysenprogramm in diesem Bereich Artefakte produziert, da 3C nicht durch Überlagerung zustande kommen kann. In dem Programm wird von einer GAUSSschen Normalverteilung der einzelnen DNA-Gipfel ausgegangen. Sollte sich der DNA-Gehalt der Kerne nicht nach der Normalverteilung verhalten, könnte durch die Approximation akzessorische Gipfel entstanden sein. Aus dem Vergleich der entsprechenden Verlaufstypen mit den Sektions-, unseren Versuchsprotokollen und mit den histologischen Schnittpräparaten ließ sich nicht erklären, inwieweit diese Tendenz als Ausdruck einer zunehmenden Myolyse interpretiert werden könnte. Einen sicheren derartigen Fall sahen wir jedoch bei der Messung eines Kinderherzens mit deutlichen Myolysezeichen, dessen ICP-Diagramm dem Verlaufstyp mit dem nach rechts verbreiterten 2C-Gipfel entsprach (Abb. 7f).

Für die widersprüchlichen Ergebnisse im 6C-Bereich erschien uns eine Überlagerung von 2C- und 4C-Kernen bei der Messung im ICP als wahrscheinlichste Erklärung.

4.3.4.

Eine mögliche Überlagerung von 2C-Kernen zugunsten eines im Vergleich zum SMP im ICP höheren 4C-Gipfel wäre als Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse bei fast der Hälfte der Vergleichsmessungen an Kinderherzen denkbar (s. Tab. 1). In Einzelfällen war

der 2C-Wert des ICP bis zu 10% niedriger als der des SMP. Wir glaubten jedenfalls nicht, daß für solche Meßunterschiede der größere statistische Fehler bei 100 Kernen pro Messung im SMP gegenüber 5000 - 20000 Kernen pro Messung im ICP als Ursache ausreicht.

Zusammenfassend können wir feststellen, daß neben der bekannten und generell als verläßlich geltenden Methode der Scanning-Mikroskopphotometrie die Impuls-Cytophotometrie trotz der hier angeführten Einschränkungen als eine brauchbare Methode zur Messung des DNA-Gehaltes von Myocardkernen anzusehen ist. Eine weitere Verfeinerung der Technik sollte Ziel weiterer Arbeiten auf diesem Gebiet sein.

4.4. Polyploidisierung bei Kinderherzen mit Fallotscher Tetralogie und TGA

Im Kapitel 3.6 konnten wir zeigen, daß für die in einzelnen Fällen abweichenden Polyploidisierungsgrade bei Kinderherzen mit Fallotscher Tetralogie und TGA meist pathologisch-anatomische Ursachen vorhanden waren. Eine genaue Relation zwischen dem Ausmaß der Polyploidisierung und der funktionellen Belastung linker und rechter Ventrikel war auf Grund der vielfältigen Fehlbildungen bei Herzen mit Fallotscher Tetralogie und TGA nicht feststellbar.

Zusammen mit den Ergebnissen von PFITZER (1971) (Tab. 1, Nr. 1 - 3, 8, 9, 12, 16, 20, 21) war es uns möglich, die Polyploidisierung bei acht Herzen mit Fallotscher Tetralogie bei einem Durchschnittsalter von sechs Jahren alterskontinuierlich von zwei bis neun Jahren und bei 15 Herzen mit TGA mit einem Durchschnittsalter von einem Jahr alterskontinuierlich von zwei Tagen bis sechs Jahren zu vergleichen.

Um die Polyploidisierung verschiedener Altersgruppen beurteilen zu können, benutzten wir als orientierendes Maß die Mittelwerte der 2C-Klasse. Wie die Abb. 8a,b zeigen, ist die Polyploidie in den meisten Fällen um so stärker ausgeprägt, je niedriger der 2C-Wert ist. Eine Ausnahme macht hier der frühere SMP-Befund des rechten Ventrikels eines 9jährigen Mädchens (Tab. 1, Nr. 8), bei dem keine

2C-Kerne gefunden worden waren.

Bei den Herzen mit Fallotscher Tetralogie fiel eine vorzeitige bzw. gesteigerte Polyploidisierung gegenüber gleichaltrigen normalen Kinderherzen (PFITZER, 1971, Tab. 1) auf, wobei diese im rechten Ventrikel wesentlich stärker ausgeprägt war als links. Die Mittelwerte der 2C-Werte in der von uns verglichenen Altersgruppe von zwei bis neun Jahren betrugen für die linken Ventrikel normaler Kinderherzen 68,3% ± 22,2% (PFITZER, 1971, Tab. 1), bei Fallotscher Tetralogie 61,8% ± 28,4%. Dagegen waren die rechten Ventrikel normaler Herzen dieser Altersgruppe mit 82,8% ± 8,6% deutlich schwächer polyploidisiert als die rechten Ventrikel der Herzen mit Fallotscher Tetralogie mit 42,6% ± 23,2%. Der Beginn der Polyploidisierung, der bei normalen Kinderherzen im Alter von 5 - 10 Jahren mit einem Herzgewicht um 100 g und in den linken Ventrikeln beschleunigt einsetzt (PFITZER, 1971, Fig. 4), konnte von uns auf Grund fehlender Daten von jüngeren Herzen mit Fallotscher Tetralogie nicht genau bestimmt werden. Er liegt aber sicherlich in einem Alter unter vier Jahren.

Beim Vergleich der DNA-Klassenverteilung der Kinderherzen mit TGA konnten wir in den besonders interessierenden rechten Herzen schon im Alter von drei und fünf Monaten eine im Vergleich zu normalen Kinderherzen vorzeitige Polyploidisierung feststellen, die im späteren Leben nicht mehr zuzunehmen scheint. Hierbei ist bemerkenswert, daß acht Kinder mit einer TGA im Alter von zwei Tagen bis fünf Wochen (Tab. 1, Nr. 11 - 18) im Vergleich zu gesunden Kindern (TANNER und WHITEHOUSE, 1976) ein normales Körpergewicht aufwiesen und erst im Alter von zwei Monaten bis sechs Jahren mit ihrem Körpergewicht unterhalb der 3. Perzentile lagen. Von unseren sieben Fällen waren fünf untergewichtig (Tab. 1, Nr. 19 - 22, 25). Dahingegen waren von acht Fällen mit Fallotscher Tetralogie im Alter von zwei bis neun Jahren nur zwei im Alter von acht und neun Jahren untergewichtig. Diesem unterschiedlichen Verhalten des Körpergewichtes entspricht der funktionelle Zusammenhang zwischen belastetem und damit gesteigert und vorzeitig polyploidisiertem rechten Ventrikel und dem großen Körperkreislauf bei Herzen mit TGA.

Bei 12 Herzen mit TGA im Alter von zwei Tagen bis neun Monaten

konnten wir keinen Unterschied der Polyploidie gegenüber normalen Herzen feststellen. Erst die linken Ventrikel von drei Fällen im Alter von ca. 3 - 6 Jahren erreichten eine deutliche Polyploidisierung. Sie reduziert den Anteil diploider Kerne auf 41,7% ± 14,6% und ist damit stärker ausgeprägt als bei gleichaltrigen normalen Herzen mit 76,0% ± 26,4%. Der linke Ventrikel des 30jährigen Mannes mit einer dieser Altersgruppe entsprechenden Polyploidisierung läßt vermuten, daß die Polyploidisierung linker Ventrikel mit zunehmendem Alter nicht mehr gesteigert wird.

Unter Berücksichtigung von neun älteren Fällen (PFITZER, 1971) kann zusammenfassend festgestellt werden, daß die Polyploidisierung in belasteten rechten Herzen vorzeitig auftritt. Dieses scheint bei Herzen mit TGA bis zum Alter von 3 - 5 Monaten stattzufinden, bei Herzen mit Fallotscher Tetralogie im Alter unter vier Jahren. Bei den linken Ventrikeln sind die Herzen mit Fallotscher Tetralogie bis zum Alter von neun Jahren nur wenig stärker polyploidisiert als normale Kinderherzen. Bei den TGAs weisen die linken Ventrikel bereits im Alter von 3 - 6 Jahren eine gegenüber normalen Herzen gesteigerte Polyploidisierung auf.

Bei Betrachtung der Ergebnisse über die Polyploidisierung bei hypertrophierten Erwachsenenherzen und Kinderherzen mit congenitaler Fehlbildung können wir abschließend feststellen, daß insgesamt einer unterschiedlichen Belastung der Herzen eine bei verschiedenen Lebensaltern unterschiedliche Reaktion sowohl der Myocardkerne als auch der Kerne im Interstitium entspricht.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Wir untersuchten in dieser Arbeit die Vor- und Nachteile der in kurzer Zeit eine große Anzahl von Registrierungen erlaubenden Impuls-Cytophotometrie im Vergleich zur Scanning-Cytophotometrie bei der Messung des DNA-Gehaltes menschlicher Myocardkerne. Als Material für die vergleichenden DNA-Messungen dienten uns 17 Herzen mit angeborenen Mißbildungen (Fallotsche Tetralogie und TGA), 22 hypertrophierte und 12 normalgewichtige Erwachsenenherzen. Zur Isolation der Zellen benutzten wir 0,1%ige Collagenase. Die Präparation zur Messung im ICP erfolgte mit 1%iger Ribonuclease-Lösung, weitere Inkubation mit Pepsin und Kernfärbung mit Ethidiumbromid. Zur Analyse der ICP-Diagramme benutzten wir ein Computerprogramm (VYSKA et al., 1977).

Die Messungen im SMP bestätigten hinsichtlich des Polyploidisierungsgrades führe Ergebnisse. Die im SMP gewonnenen Werte für die einzelnen DNA-Klassen stehen in signifikanter Korrelation zu dem relativen Herzgewicht normalgewichtiger und hypertrophierter Erwachsenenherzen.

Bei den Messungen im ICP konnten Maxima im Bereich von 2C, 4C und 8C unterschieden werden. Durch die Analyse im Computer wurden weitere Einzelmaxima differenziert, die im Bereich zwischen 2C- und 4C-Maximum besondere Probleme aufwarfen. Das im ICP dominierende Maximum im 2C-Bereich entsteht durch Registrierung sowohl diploider Myocardkerne als auch diploider Fibrocytenkerne, Endothelkerne, Histiocyten und kernhaltiger Blutzellen. Mit Hilfe der im SMP gewonnenen Werte für diploide Myocardkerne berechneten wir den Anteil der Myocardkerne am 2C-Gipfel des ICP und das Verhältnis nichtmyocardialer 2C-Kerne pro myocardialem 2C-Kern. Der Anteil nichtmyocardialer 2C-Kerne ist entsprechend dem Bindegewebsanteil in hypertrophierten linken und rechten Herzen Erwachsener vermehrt und steht in Korrelation zum relativen Herzgewicht.

Die Messungen des DNA-Gehaltes von Kinderherzen mit angeborenen Fehlbildungen bestätigten, daß die Polyploidisierung in belasteten rechten Ventrikeln vorzeitig auftritt. Bei Herzen mit TGA scheint dies bis zum Alter von 3 - 5 Monaten stattzufinden, bei

Herzen mit Fallotscher Tetralogie im Alter unter 4 Jahren. Während die linken Ventrikel von Herzen mit Fallotscher Tetralogie bis zum Alter von neun Jahren nur wenig stärker polyploidisiert sind als normale Kinderherzen, wiesen sie bei Herzen mit TGA bereits im Alter von 3 - 6 Jahren eine gegenüber normalen Herzen ebenfalls gesteigerte Polyploidisierung auf.

LITERATURHINWEISE

ADLER, C.P.; HARTZ, A. and SANDRITTER, W.: Form and structure of cell nuclei in growing an hypertrophied human hearts. Beitr. Path. Vol. 161: 342-362 (1977).

ADLER, C.P. und HUECK, C.: Der DNS-Gehalt in wachsenden Menschenherzen. Verh. dtsch. Ges. Path. 55: 463-470 (1971).

ADLER, C.P. und SANDRITTER, W.: Numerische Hyperplasie der Herzmuskelzellen bei Hypertrophie. Dtsch. med. Wschr. 96: 1895-1897 (1971).

BLESSING, M.H.; VORFELD, T. und PFITZER, P.: Pathologisch-anatomische sowie einige biochemische und cytometrische Befunde bei einem Fall von Akromegalie. Sonderdruck aus Ärztl. Forsch. 25: Heft 5.

BOJAR, H.; FUCHS, F. and STAIB, W.: Demonstration of insulin receptors in the heart and sceletal muscle binding of 125-J-insuline to heart myocytes and muscular fibers isolated from adult rats. Ges. biol. chem. 357: 252 (1976).

FISCHER, B.; SCHLÜTER, G.; ADLER, C.P. und SANDRITTER, W.: Zytophotometrische DNS-, Histon- und Nicht-Histonprotein-Bestimmungen an Zellkernen von menschlichen Herzen. Beitr. path. Anat. 141: 238-260 (1970).

GÖHDE, W.; DITTRICH, W.; ZINSER, K.H. und PRIESHOF, J.: Impulscytophotometrische Messungen an atypischen Zellabstrichen aus Scheide und Cervix uteri. Geburtsh. u. Frauenheilk. 32: 382-393 (1972).

GORYSCH, H. und PFITZER, P.: Vergleichende Messungen an Ergüssen mit dem Impulscytophotometer und dem Scanning-Mikroskopphotometer. ADREEFF, M.: Impulscytophotometrie, Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York (1975).

HILFER, S.R. and BROWN, J.M.: Collagenase. Exptl. Cell. Res. 65: 246-249 (1971).

KNIERIEM, H.J.: Über den Bindegewebsgehalt des Herzmuskels des Menschen. Arch. Kreislaufforsch. 44: 231-259 (1964).

PFITZER, P.: Nuclear DNA content of human myocardial cells. Curr. Top. Path. 54: 125-169 (1971a).

PFITZER, P.: Analysis of tumor cell populations by DNA cytophotometry. NIEBURGS, H.E.: Prevention and detection of cancer, Marcel Dekker, New York (1978).

PFITZER, P. und CAPURSO, A.: Der DNS-Gehalt der Zellkerne im Herzohr des Menschen. Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 5: 254-267 (1970).

PFITZER, P. and SCHULTE, H.D.: The nuclear DNA content of myocardial cells of monkeys as a model for the polyploidization in the human heart. Medical Primatology 1972. Proc. 3rd Conf. exp. Med. Surg. Primates, Lyon 1972, part I, pp. 379-389 (Karger, Basel, 1972).

PFITZER, P.; VYSKA, K. und STECHER, G.: Zur Analyse von DNA-Histogrammen durch Computer. Beitr. Path. Bd. 159: 157-185 (1976).

SANDRITTER, W. and SCOMAZZONI, G.: Deoxyribonucleic acid content (Feulgen photometry) and dry weight (Interference microscopy) of normal and hypertrophied heart muscle fibers. Nature 202: 100-101 (1964).

SCHNEIDER, R. und PFITZER, P.: Die Zahl der Kerne in isolierten Zellen des menschlichen Myocards. Virchows Arch. Abt. B. Zellpath. 12: 238-258 (1972).

SCHUMANN, J.; EHRING, F.; GÖHLDE, W. und DITTRICH, W.: Impulscytophotometrie der DNS in Hauttumoren. Arch. klin. exp. Derm. 239: 377 (1971).

SPRENGER, E.; BÖHM, N. und SANDRITTER, W.: Durchflußfluoreszenzcytophotometrie für die gynäkologische Krebsvorsorge. Dtsch. Med. Wschr. 25: 1099 (1971).

STECHER, G.; BLOEMERTZ, H. und PFITZER, P.; Sarkom 180: Wachstum und Regression. Vergleichende Messungen mit dem Impuls- und Scanningzytophotometer sowie histologische, zytologische und autoradiographische Untersuchungen. Beitr. Path. Bd. 158: 255-286 (1976).

TANNER, J.M. and WHITEHOUSE, R.H.: Human growth. Arch. Dis. childh. 51: 170 (1976).

VYSKA, K.; PFITZER, P. und KRAUSHAAR, J.: Computeranalyse von DNA-Histogrammen. Verh. Dtsch. Ges. Path. 61: 479 (1977).

Unser ganz besonderer Dank für die stets hilfsbereite und lehrreiche Unterstützung bei der Klärung experimenteller Probleme und der schriftlichen Ausarbeitung gilt Herrn Prof. Dr. Dr. P. PFITZER.

Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung unserer Ergebnisse bedanken wir uns bei den Herren Dr. K. VYSKA und Dipl.-Phys. J. KRAUSHAAR.

Weiterhin sind wir den medizinisch-technischen Assistentinnen der Cytopathologischen Abteilung des Pathologischen Institutes der Universität Düsseldorf, Frau KÖNIG und Frau BIESEMANN, für die freundliche Hilfe während der experimentellen Arbeit sehr dankbar.

LEBENSLAUF

Name:	Harm	
Vorname:	Margrit	
Geburtsdatum:	7.12.1949	
Geburtsort:	Bad Segeberg	
Staatsangehörigkeit:	deutsch	
Familienstand:	ledig	
Schulbildung:	1956 - 1959	Grundschule
	1959 - 1966	Realschule Abschluß: Mittlere Reife
	1970 - 1971	Physikalisch-Technische Lehranstalt Wedel Abschluß: Techn. Assistentin für Physik
	1968 - 1970	Philips Zentrallaboratorium Hamburg
	1970 - 1971	Phys.-Techn. Lehranstalt Abschluß: Ing. grad.
	1971 - 1972	Henkel & Cie, Düsseldorf
	SS 1972 - SS 1979	Medizinstudium
	1979	Approbation

Seit Juli 1979 als Assistenzarzt im Krankenhaus Neuwerk in der Ausbildung zum Arzt für Gynäkologie und Geburtshilfe.

LEBENSLAUF

Ich wurde am 11.09.1951 in Bad Wildungen geboren. Meine Schulzeit verbrachte ich in Fulda. Von 1957 bis 1961 besuchte ich dort die Volksschule und von 1961 bis 1970 das Freiherr-vom-Stein-Gymnasium. Nachdem ich im Sommer 1970 das Abitur im neusprachlichen Zweig erfolgreich bestanden hatte, leistete ich vom 01.10.1970 bis 30.03. 1972 meine Wehrpflichtzeit bei der Bundeswehr ab. Direkt nach Beendigung der Bundeswehrzeit begann ich in Düsseldorf mein Humanmedizinstudium. Im Oktober 1979 bestand ich die 3. Ärztliche Prüfung und erhielt im November 1980 die Approbation als Arzt. Seit 01. Januar 1980 bin ich als Assistenzarzt beruflich tätig.

Düsseldorf, den 10.12.1980

(Rainer Jacksch)